

“CIGARRINHA-DAS-RAÍZES EM CANA-DE-AÇÚCAR:
RESISTÊNCIA GENOTÍPICA E INTERAÇÃO PLANTA-PRAGA”

Eduardo Rossini Guimarães
Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SP – BRASIL

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

“CIGARRINHA-DAS-RAÍZES EM CANA-DE-AÇÚCAR:
RESISTÊNCIA GENOTÍPICA E INTERAÇÃO PLANTA-PRAGA”

Eduardo Rossini Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia – área de concentração Produção Vegetal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2007

Guimarães, Eduardo Rossini
G963c Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar: resistência genotípica
e interação planta-praga/ Eduardo Rossini Guimarães. --
Jaboticabal, 2007
iii, 53 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Miguel Ângelo Mutton

Co-orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro

Banca examinadora: Aílto Antonio Casagrande, Odair Aparecido
Fernandes, Jorge Alberto da Silva, Marcelo de Almeida Silva

Bibliografia

1. *Saccharum* spp.. 2. *Mahanarva fimbriolata*. 3. Variedades. 4.
Antibiose. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 633.61:632

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EDUARDO ROSSINI GUIMARÃES – nasceu aos 19 de maio de 1979, na cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Em Julho de 1997 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Lavras. Durante a faculdade foi monitor de citologia, bolsista do Programa Especial de Treinamento (PET/CAPE/MEC) e do PIBIC/CNPq, membro do Diretório Central dos Estudantes e membro da Diretoria de Assuntos Internacionais da UFLA. Em julho de 2002 recebeu o título de Engenheiro Agrônomo e ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Faculdade de Ciências e Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP. Durante o curso, desenvolveu pesquisas relacionadas à fisiologia da produção e maturação da cana-de-açúcar. Foi bolsista CAPES e representante discente junto ao conselho do curso, além de tesoureiro da Associação dos Pós-graduandos. Obteve o título de mestre em Agronomia (Produção Vegetal) em janeiro de 2004. Em março do mesmo ano ingressou no curso de doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) na mesma instituição, quando estudou a interação da cana-de-açúcar com a cigarrinha-das-raízes. Realizou parte do doutoramento junto à Texas A&M University, Estados Unidos. Obteve o título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal) em Novembro de 2007.

"O conformismo é o carcereiro da liberdade e o inimigo do crescimento"

John Kennedy

À minha mãe Marineide

Que dedicou uma vida inteira de suor e sangue para nos oferecer a
melhor educação,

Que compartilhou conosco cada vitória, cada conquista e cada
dificuldade,

Que nos ensinou a lutar e a ser dignos,

Que nos fez cidadãos de bem,

Pelo seu amor, por suas palavras,

Pelas preces e noites em claro,

Pelos sábios conselhos e pela doce amizade

Aos meus queridos irmãos Mariana, Alexandre e Arthur

Com quem compartilho tantos sonhos,

Pela amizade e pelos bons exemplos,

Pelos momentos de alegria,

Pela união e conforto nas dificuldades

À minha amada esposa Gisele

Por sua dedicação, amor e companhia,

Por sua doçura e paciência,

Por me fazer feliz

DEDICO

Aos meus sogros João e Zilda e ao meu cunhado Paulinho
Pela dedicação, pelo amor e carinho,
Pelo exemplo de vida, de honestidade e dignidade,
Pelas muitas alegrias que compartilhamos,
Pelo apoio em todas as horas

Aos meus queridos tios Miguel e Márcia
Que me ensinaram, apoiaram, confiaram, ouviram
Pelas oportunidades, pelas muitas alegrias
Pelo ombro amigo nas dificuldades

Ao meu querido tio 'Toninho'
Por estar sempre presente
Como deve um pai ser,
Por nos apoiar e confortar,
Pelas alegrias que compartilhamos

À minha querida avó Edith
Que a nós tanto dedicou,
Por sua doçura e carinho,
Por seu amor de uma vida

Aos queridos tios Carlinhos e Martha
Pela torcida, pelo carinho, pela presença
Pelo exemplo

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- ✓ À CAPES pela bolsa de doutoramento e 'Sandwich'(processo 272905-9).
- ✓ À Fapesp pelo apoio financeiro para a condução dos experimentos (processo 2005/03333-4).
- ✓ À Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. pelo apoio financeiro para condução dos experimentos.
- ✓ Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, por seus ensinamentos, por sua paciência e exemplo profissional; pela amizade, conselhos e oportunidades.
- ✓ À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pela dedicação, ensinamentos, paciência e pela amizade.
- ✓ Ao Prof. Dr. Jorge Alberto da Silva da Texas A&M University pelo acolhimento, ensinamentos, conselhos e amizade.
- ✓ À Profa. Dra. Márcia J. R. Mutton, pelos ensinamentos, pelo exemplo profissional e pelos conselhos.
- ✓ Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Jorge A. Da Silva, Dr. Marcelo de Almeida Silva, Prof. Dr. Aílto Antônio Casagrande e Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes pelas valiosas contribuições para a melhoria deste trabalho.
- ✓ Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, por seus conselhos, ensinamentos e amizade.
- ✓ Ao Eng. Agr. Gustavo Nogueira da Copercana pela cana semente.
- ✓ À Nora Solis-Gracia, da Texas A&M University, pelo acolhimento, amizade e pelo auxílio na condução experimental.
- ✓ Às amigas do LBM Karina, Gisele, Daniele e Flávia pela preciosíssima ajuda no experimento de biologia molecular e pela amizade.
- ✓ Aos amigos Eduardo Tiraboschi, Gisele, Leonardo, Daniel (Kaspa), Neto, David, Henrique (Sazon) pelo auxílio na condução dos experimentos.
- ✓ Aos amigos do laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool: Sérgio, Gisele, Eduardo Tiraboschi, Leonardo, Neto, Cidinha, Débora, Leandro, Kelly, Mariana, Lidiane, Henrique (Sazon), Vitor; e aos ex-alunos Daniel (Kaspa), Flávia, David, Bruna, Marisol, Álvaro, Pablo, Diane, Thaís,

Rogério (Jakú), Gustavo, Geancarlo, Marco, Fabiano, Fernanda, Ronaldo, Gabriela (Garça) e Munira, pela agradável convivência e amizade.

- ✓ À minha família pela torcida, pelas alegrias e pelo apoio
- ✓ Aos amigos Arlei Prado e Claudine de Bona pelo apoio nas horas difíceis e pelos bons momentos que passamos juntos.
- ✓ Aos amigos Jorge da Silva, Denise Rossi, Pedro Rossi Silva, Rafael Rossi Silva e Gabriel Rossi Silva, Marcelo Silva, Marina Caputo, Pedro e Luísa Silva, pelo acolhimento, pelo clima familiar e pelas alegrias.
- ✓ Aos amigos Francesco Margara, Vivek Sharma, Justin Butcher, Marco Pineda, Armando Lários, Alexandra Gómez-Plata e Carolina Avellaneda pelo acolhimento e pelas alegrias.
- ✓ A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e minha formação profissional.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
RESUMO.....	ii
SUMMARY.....	iii
CAPÍTULO I – Considerações gerais.....	1
Referências.....	2
CAPÍTULO II.....	4
Resumo.....	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Material e Métodos.....	8
Resultados e Discussão.....	12
Conclusões.....	21
Referências.....	22
CAPÍTULO III.....	27
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos	30
Resultados e Discussão.....	33
Referências.....	38
CAPÍTULO IV.....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	47
Conclusões.....	50
Referências.....	51

CIGARRINHA-DAS-RAÍZES EM CANA-DE-AÇÚCAR: RESISTÊNCIA GENOTÍPICA E INTERAÇÃO PLANTA-PRAGA

RESUMO

A cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) tem causado prejuízos significativos aos canaviais da região Centro-Sul do Brasil. No entanto a interação desta praga com a cana-de-açúcar é pouco caracterizada e existem poucas pesquisas sobre resistência varietal. Neste trabalho comparamos a reação de genótipos de cana-de-açúcar à infestação dessa praga e estudamos a interação através de análises de crescimento de plantas, acúmulo de biomoléculas relacionadas a estresses e biologia do inseto. Os resultados obtidos representam evidência de resistência do tipo antibiose a cigarrinha na variedade SP83-5073, tendo sido identificado um fragmento de DNA possivelmente relacionado com a resistência. Os genótipos SP80-1816 e RB72454 mostraram-se mais suscetíveis à praga. Também verificamos que existem mecanismos distintos para a percepção do estresse hídrico e do estresse promovido pela praga, indicando que os teores de prolina livre não podem ser utilizados para quantificar o estresse promovido por *M. fimbriolata* em cana-de-açúcar. A cultivar RB72454 é mais tolerante ao déficit hídrico do que a cultivar SP80-1816. O aumento na concentração de compostos fenólicos nos genótipos suscetíveis SP80-1816 e RB 72454 indicam que o acúmulo pode ser decorrente da morte e apodrecimento das raízes. Não foi observada variação nos níveis de fenóis totais na variedade SP 85-5073 submetida à infestação de *M. fimbriolata*. A mortalidade da cigarrinha-das-raízes e a duração da fase de ninfas foram significativamente maiores nesse genótipo, indicando a existência de resistência do tipo antibiose.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., *Mahanarva fimbriolata*, variedades, antibiose

SPITTLEBUG INFESTATION IN SUGARCANE: GENOTYPICAL RESISTANCE AND PLANT-PEST INTERACTION

ABSTRACT

The spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) has caused significant losses to sugarcane fields in the center-south of Brazil. However, the interaction of this pest with sugarcane has not yet been characterized and few works have studied varietal resistance. In this work we compare the reaction of sugarcane genotypes to spittlebug infestation and study the plant-pest interaction through plant growth analyses, accumulation of stress-related biomolecules and pest biology. Evidence of resistance through an antibiosis mechanism was observed in SP83-5073 and a DNA fragment was found to be possibly related to this resistance. The genotypes SP80-1816 and RB72454 have shown to be more resistant to the pest. We also observed that there are different perception mechanisms for water restriction and spittlebug infestation, indicating that proline levels cannot be used to measure the level of stress promoted by *M. fimbriolata* nymphs. The variety RB72454 is more tolerant to water deficit than SP80-1816. The increased concentration of phenolic compounds in the susceptible genotypes SP80-1816 and RB 72454 indicates this accumulation may be due to root death. No variation was observed in the levels of total phenolics in SP 85-5073 submitted to *M. fimbriolata* infestation. Spittlebug mortality and duration of nymph phase were higher in this variety, indicating the existence of an antibiosis mechanism.

Key words: *Saccharum* spp., *Mahanarva fimbriolata*, varieties, antibiosis

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o aumento da colheita mecanizada da cana-de-açúcar sem queima prévia da palha, a cigarrinha-das-raízes tornou-se um dos principais problemas fitossanitários da cultura, ocasionando perdas na produtividade de colmos e de açúcar (Dinardo-Miranda et al., 1999), além de interferir negativamente nos processos de produção de açúcar (Presotti, 2005) e álcool (Gonçalves, 2003).

Os hospedeiros naturais da cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) são principalmente gramíneas nativas da região norte do Brasil e as do gênero *Brachiaria* (Mendonça et al., 1996), enquanto a cana-de-açúcar é um hospedeiro alternativo. A cobertura vegetal deixada no solo após a colheita propicia condições de umidade e temperatura favoráveis ao desenvolvimento desta praga (Dinardo-Miranda et al., 2000).

As ninfas de *M. fimbriolata* sugam as raízes e atingem os vasos xilemáticos, deteriorando-os e dificultando ou até impedindo o fluxo de água e nutrientes (Horsfield, 1978).

O ataque da cigarrinha-das-raízes tem como consequência a redução da taxa fotossintética, consequentemente reduzindo o desenvolvimento da planta e acarretando em perdas de produtividade de colmos e sacarose (Mendonça et al., 1996).

Diversas pesquisas têm sido dedicadas ao controle desta praga, que pode ser químico (Dinardo-Miranda et al., 2000; 2001a; 2001b; 2002), cultural (Dinardo-Miranda et al., 2000) ou biológico (Dinardo-Miranda, 2000; Benedini, 2003). Da mesma maneira, relativamente poucos trabalhos se dedicaram ao estudo da interação de insetos sugadores com a cana-de-açúcar. Uma das ferramentas mais importantes no manejo integrado de pragas é a utilização de variedades resistentes. Entretanto, apesar de a *M. fimbriolata* ter se tornado uma das pragas-chave da cana-de-açúcar, são escassas as pesquisas sobre resistência varietal.

A caracterização dos mecanismos de defesa da planta seria útil ao melhoramento genético e ao estabelecimento de novas estratégias de controle,

bem como a identificação dos genes envolvidos na interação da cana-de-açúcar com *M. fimbriolata*.

REFERÊNCIAS

BENEDINI, M.S. Ganhando da cigarrinha-da-raiz na técnica. **Idea News**, ano IV, n. 32, p.50-70, 2003.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FIGUEIREDO, P.; LANDELL, M.G.A.; FERREIRA, J.M.G.; CARVALHO, P.A.M. Danos Causados pelas Cigarrinhas-das-Raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a Diversos Genótipos de Cana-de-Açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.17, n.5, p.48-52, 1999.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FERREIRA, J.M.G.; DURIGAN, A.M.P.R.; BARBOSA, V. Eficiência de inseticidas e medidas culturais no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.18, n.3, p.34-6, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; MOSSIN, G.C.; DURIGAN, A.M.P.R.; BARBOSA, V. Controle Químico de Cigarrinha-das-Raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em Cana-de-Açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.19, n.4, p.20-3, 2001a.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GARCIA, V.; COELHO, A.L. Eficiência de Inseticidas no Controle da Cigarrinha-das-Raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em Cana-de-Açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.20, n.1, p.30-3, 2001b.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GARCIA, V.; PARAZZI, V.J. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemíptera:Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, v.31, n.4, p. 909-14, 2002.

GONÇALVES, T.D. **Danos causados por *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar: reflexos na qualidade da matéria-prima e fermentação etanólica.** Jaboticabal, 2003,51f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

HAGLEY, E.A.C.; BLACKMAN, J.A. Site of feeding of the sugarcane froghopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Homoptera:Cercopidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 59, n. 6, p. 1289-1291, 1966.

HORSFIELD, D. Evidence for xylem feeding by *Philaenus spumarius* L. (Homoptera: Cercopidae). **Entomology Experiments and Applications**, vol. 24, p. 95-99, 1978.

MENDONÇA, A.F.; BARBOSA, G.V.S.; MARQUES, E.J. As cigarrinhas da Cana-de-Açúcar (Hemíptera:Cercopidae) no Brasil. In: MENDONÇA, A.F. (ed.) **Pragas da Cana-de-Açúcar**. Insetos & Cia. Maceió. 200p. il. 1996.

PRESOTTI, L. E. **Danos causados pela *Mahanarva fimbriolata* na cana-de-açúcar na qualidade da matéria-prima e no xarope produzido.** 2005. 53f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

CAPÍTULO II - EVIDÊNCIA DE RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR À CIGARRINHA-DAS-RAÍZES *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854) (HEMIPTERA:CERCOPIDAE)

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar resistência genotípica a *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Experimentos sem chance de escolha foram realizados em casa de vegetação sob condições controladas, em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 4, com três variedades de cana-de-açúcar SP80-1816 (suscetível), RB72454 (suscetível) e SP83-5073 ('menos infestada' em observações de campo), dois níveis de infestação (controle e 10 ninfas por planta) e quatro épocas de amostragem. A duração da fase ninfal, taxa de mortalidade e o crescimento das plantas foram analisados. Também foi conduzido um experimento de cDNA-AFLP com o objetivo de detectar a expressão gênica diferencial das variedades SP80-1816 e SP83-5073 sob ataque de ninfas de cigarrinha. A taxa de mortalidade e a duração da fase ninfal foram significativamente maiores na variedade SP83-5073. A análise de crescimento demonstrou que esse genótipo não sofreu danos com a infestação de *M. fimbriolata*. Através do experimento de cDNA-AFLP foi possível identificar um fragmento de 250 pb expresso na variedade SP83-5073 as 24 e 48 h após a infestação, que pode estar relacionado com a resposta à praga. Os resultados aqui apresentados são fortes indícios de resistência do tipo antibiose a cigarrinha na variedade SP83-5073, e confirmam a suscetibilidade de SP80-1816 e RB72454.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharum* spp., antibiose, variedades, cDNA-AFLP, expressão diferencial.

EVIDENCE OF SUGARCANE RESISTANCE TO THE SPITTLEBUG *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854) (HEMIPTERA:CERCOPIDAE)

ABSTRACT

This work was undertaken to study genotypical resistance to *Mahanarva fimbriolata* in sugarcane (*Saccharum* spp.). No-choice experiments were set in a greenhouse under controlled conditions and arranged in completely randomized design in a 3 x 2 x 4 factorial, with three varieties: SP80-1816 (susceptible), RB72454 (susceptible) and SP83-5073 ('less infested' in field observations); two infestation levels (control and 10 nymphs per plant) and four sampling dates. Spittlebug mortality rate and duration of nymph phase were determined, and a plant growth analysis was conducted. Also, a cDNA-AFLP experiment was carried out to detect differential gene expression of SP80-1816 and SP83-5073 under spittlebug attack. Significantly higher mortality rate and longer duration of nymphs phase were observed in SP83-5073. Growth analysis indicated this variety suffered no effect of *M. fimbriolata* infestation. The cDNA-AFLP experiment demonstrated a 250-bp fragment differentially expressed in SP83-5073, at 24 and 48 h after infestation, which may encode a pathogenesis-related protein. Our results provide strong evidence of spittlebug resistance through antibiosis in the variety SP83-5073, and confirm the susceptibility of SP80-1816 and RB72454.

KEY WORDS: *Saccharum* spp., antibiosis, varieties, cDNA-AFLP, differential expression.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das gramíneas cultivadas mais importantes do mundo. No Brasil, é plantada para produzir açúcar, cachaça, energia, e etanol, um combustível renovável, menos poluente que os derivados de petróleo e de custo relativamente baixo. Nos últimos anos, praticamente todas as montadoras de automóveis do país lançaram novos modelos bi-combustíveis, que funcionam com gasolina, etanol ou qualquer combinação de ambos. O país é auto-suficiente em combustível e exporta o produto para a China, Japão, EUA, entre outros.

A colheita da cana pode ser feita manualmente, o que requer mão-de-obra barata e abundante, ou mecanicamente. A colheita mecanizada de cana sem queima prévia de palha tem crescido em muitos países por razões econômicas e para redução da emissão de CO₂. No Estado de São Paulo, por exemplo, uma lei estadual impõe que até o ano 2021 100% das áreas mecanizáveis sejam colhidas “cruas”, ou seja, sem queima da palhada.

A queima da palhada previne o acúmulo de inóculo de doenças e pragas ao longo dos cortes da cana-de-açúcar. Por outro lado, a colheita sem queima pode resultar em diferentes padrões de infestação de pragas e plantas daninhas (Meyer et al., 2005).

As cigarrinhas estão amplamente distribuídas nas Américas e no Caribe (Fewkes, 1969; Thompson, 2004). A espécie *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera:Cercopidae) não era considerada uma praga-chave até recentemente na região Centro-Sul, uma vez que prejuízos significativos não ocorriam com frequência (Mendonça et al., 1996). Entretanto, ao longo dos últimos anos, com o aumento da colheita mecanizada de cana crua, *M. fimbriolata* tornou-se uma das pragas mais importantes da região. Esse sistema de colheita deixa uma camada de palha abundante no solo, propiciando um ambiente de elevada umidade e temperatura estável que é favorável ao desenvolvimento de ninfas de cigarrinha (Mendonça et al., 1996; Dinardo-Miranda et al., 2001a). A queima da palha antes da colheita destrói todas as formas de cigarrinhas, especialmente os ovos em diapausa (Dinardo-Miranda et al. 1999; 2001b).

As fêmeas ovipositam na camada de palha, próxima aos colmos. As ninfas eclodem dos ovos e buscam raízes jovens pra se alimentarem da seiva do xilema. O ataque de ninfas de cigarrinha resulta em desordem metabólica generalizada, desidratação dos colmos, secamento dos vasos condutores, colmos afinados e “coração morto” (Gallo et al., 2002; Macedo & Macedo, 2004).

Nos Estados Unidos, existem poucos registros de espécies de cigarrinha causando perdas significativas em cana-de-açúcar. Entretanto, no México, a espécie *Aeneolamia postica* tem se tornado uma praga importante, trazendo perdas de produtividade de até nove toneladas por hectare (Cruz-Llanas et al., 2005).

Apesar da redução na produtividade de colmos e na qualidade da cana em virtude do ataque de cigarrinhas, poucas pesquisas têm sido dedicadas à interação dessa praga com a cana-de-açúcar. Diversos trabalhos estudaram os controles químico (Dinardo-Miranda et al., 2000; 2001a; 2002; 2006a), biológico (Dinardo-Miranda et al.; 2000Garcia et al., 2006) e cultural (Dinardo-Miranda et al., 2000). Entretanto, atualmente existe pouca informação no tocante à resistência varietal de cana-de-açúcar às cigarrinhas.

O presente trabalho foi conduzido pra estudar a resistência varietal da cana-de-açúcar à *M. fimbriolata* em três genótipos, dois dos quais já relatados como suscetíveis (Dinardo-Miranda et al., 1999; Dinardo-Miranda, 2004; Silva et al., 2005), e um que tem apresentado baixos níveis de infestação no campo (Dinardo-Miranda, 2003). Além disso, comparamos os perfis de expressão gênica de genótipos de cana-de-açúcar com diferentes reações à *M. fimbriolata* através de um experimento de cDNA-AFLP. A identificação de genes envolvidos na interação da cana-de-açúcar com a cigarrinha-das-raízes pode permitir a caracterização de mecanismos de defesa que seriam úteis ao desenvolvimento de novas estratégias de controle e ao melhoramento genético da cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Um experimento sem chance de escolha foi conduzido em casa de vegetação, localizada no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, sob condições de temperatura e umidade controladas (22 a 33°C; HR = 50 a 60%), Mini-toletes de uma gema das variedades SP80-1816 (suscetível, Dinardo-Miranda, 2004; Silva et al., 2005), RB72454 (suscetível, Dinardo-Miranda et al., 1999; Dinardo-Miranda, 2004) e SP83-5073 ('menos infestada', Dinardo-Miranda, 2003) foram plantados em bandejas de isopor de 64 células (5 x 10 cm) contendo substrato à base de vermiculita (Plantmax ® HT, Eucatex).

Vinte e sete dias após o plantio (DAP), as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos de 15 litros (1 plântula por vaso) contendo solo fertilizado de textura média. As plantas foram irrigadas diariamente até a capacidade de campo. Com o objetivo de manter a umidade do solo e estabilizar a temperatura para a infestação de ninfas de cigarrinhas, os vasos foram cobertos com 65 g de pontas e folhas de cana-de-açúcar moídas e secas ao sol (70-80% de massa seca, correspondente a 9 t ha⁻¹), simulando a palha que é deixada no campo após a colheita da cana-de-açúcar, 17 dias antes da infestação.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2 x 4, com 3 genótipos de cana-de-açúcar, 2 níveis de infestação, e 4 épocas de amostragem, com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Criação e infestação de ninfas de cigarrinha-das-raízes

As ninfas foram criadas exatamente como descrito por Garcia et al. (2006b). A infestação de ninfas de 21 dias de idade foi realizada aos 94 DAP, com auxílio de um pincel macio n. 4, nos níveis: 0 (testemunha) e 10 ninfas por planta. A espuma foi transferida abundantemente junto com as ninfas, para garantir a sobrevivência após a infestação.

Os vasos foram cobertos com tela de náilon de 100 mesh para isolar o efeito dos adultos sugadores de folha e evitar a migração de ninfas (teste sem chance de escolha). A presença de adultos foi monitorada diariamente e os indivíduos encontrados eram contados e imediatamente mortos. O efeito dos adultos não foi estudado para evitar novas oviposições que resultariam em variação indesejável. Além disso, de acordo com Dinardo-Miranda (2004) o dano mais importante da praga é causado pelas ninfas.

Análise de crescimento das plantas

O efeito das ninfas de cigarrinha sobre o crescimento da cana-de-açúcar foi avaliado aos 8, 17, 39 e 68 DAI, através da massa fresca e seca de folhas, colmos e raízes, diâmetro e altura de colmos.

A altura dos colmos foi medida a partir do solo até a primeira aurícula visível, com auxílio de uma régua, enquanto o diâmetro foi determinado com auxílio de um paquímetro na porção mediana do colmo.

As plantas foram dissecadas em folhas, colmos e raízes e determinou-se a massa fresca. Para remover as partículas de solo, as raízes foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha. Após a pesagem, as amostras eram colocadas em sacos de papel e submetidas à secagem em uma estufa de circulação forçada de ar a 70 °C até massa constante, determinando-se a massa seca.

Duração da fase ninfal e taxa de mortalidade de *M. fimbriolata*

A presença de adultos na rede de náilon foi monitorada diariamente. Sempre que os adultos eram encontrados, sua quantidade e o número de dias após a infestação eram registrados. A duração da fase ninfal (dias) foi determinada através de média ponderada, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{DFN (dias)} = \frac{(Y_{na} \times Z_n) + (Y_{na} \times Z_{n+1}) + (Y_{na} \times Z_{n+2}) + \dots + (Y_{na} \times Z_{n+a})}{\text{Número de adultos}}$$

Em que:

Y_{na} = Número de adultos encontrados no dia

$Z_n \dots n+n$ = Número de dias após a infestação (DAI) + 21 (idade das ninfas no momento da infestação)

Para o cálculo da taxa de mortalidade, a cobertura de palha foi removida no momento das coletas da análise de crescimento e o número de ninfas foi contado. O número de adultos encontrados em cada vaso nas observações diárias foi somado ao número de ninfas, e a taxa de mortalidade foi obtida através da fórmula:

$$TM(\%) = \left(1 - \frac{NN + NA}{10 \text{ ninfas}} \right) \times 100$$

Em que:

TM (%) = taxa de mortalidade

NN = número de ninfas

NA = número de adultos

Experimento de expressão diferencial por cDNA-AFLP

A técnica de cDNA-AFLP foi utilizada para estudar a expressão gênica diferencial por sua simplicidade e custo relativamente baixo, se comparada a micro arranjos de cDNA, por exemplo. Essa técnica permite a comparação de qualquer quantidade de amostras e menos de 5 µg de RNA são necessários para até 240 reações, o que é interessante já que quantidades relativamente baixas de RNA de boa qualidade foram obtidas a partir de tecidos de raiz de cana-de-açúcar. Outra vantagem é que o cDNA-AFLP detecta pequenas diferenças de expressão,

a partir de 10%. A maior limitação da técnica é a alta ocorrência de falsos positivos, que pode ser minimizada pelo uso de repetições de cada reação e de mais de um indivíduo para cada condição (Bachem et al., 1998).

Mini-toletes de uma gema das variedades SP80-1816 (suscetível, Silva et al., 2005; Dinardo-Miranda, 2004) e SP83-5073 ('menos infestada', Dinardo-Miranda, 2003) foram plantadas em copos plásticos descartáveis de 300mL contendo o substrato Plantmax HT ® (Eucatex), e irrigados diariamente até a capacidade de campo. As plantas foram mantidas em uma câmara de crescimento (modelo 095E, Fanem, São Paulo) com temperatura ajustada para 25 °C e fotoperíodo de 14 h. Foram utilizadas duas plantas por tratamento para garantir raízes de qualidade para extração de RNA.

A infestação de ninfas de segundo instar foi realizada como descrito acima, aos 77 DAP, utilizando-se cinco ninfas por planta. As amostras de raízes foram coletadas pouco antes da infestação, e 1, 2, 7 e 14 dias após (DAI), e imediatamente armazenadas em N₂ líquido, até a extração de RNA total.

O RNA total foi extraído de amostra de raízes de 3g, utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, e precipitado pela adição de 10% de acetato de sódio (3 mol l⁻¹, pH 5.2) e 2 volumes de etanol absoluto 100% a -20 °C agitando-se gentilmente. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o uso.

As amostras foram centrifugadas para recuperação do RNA total, e o "pellet" resultante foi lavado duas vezes com etanol 70% (-20°C) para remoção de sais residuais. O RNA Poli(A)+ foi purificado a partir de alíquotas de 200 µg de RNA total com o kit MicroPoly(A) Purist™ (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA poli(A)+ utilizando-se o SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen).

Os cDNAs foram então utilizados em análises de cDNA-AFLP (Bachem et al., 1998) utilizando o AFLP® Expression Analysis Kit (LI-COR Biosciences). Das 64 combinações possíveis de iniciadores, utilizamos as oito que apresentaram maior polimorfismo para cana-de-açúcar em experimentos anteriores. Todas as

oito combinações apresentaram amplificação adequada de cDNA, e quatro se destacaram pelo melhor polimorfismo e foram, portanto, selecionadas (Tabela 1).

Tabela 1. Combinações de iniciadores selecionadas (LI-COR).

Combinação	Iniciador MseI	Iniciador marcado IRDye (TaqI)
I	GAT GAG TCC TGA GTA ACA	GAT GAG TCC TGA CCG AGA
II	GAT GAG TCC TGA GTA ACT	GAT GAG TCC TGA CCG AGA
III	GAT GAG TCC TGA GTA AAC	GAT GAG TCC TGA CCG AGT
IV	GAT GAG TCC TGA GTA AAG	GAT GAG TCC TGA CCG AGT

A eletroforese foi realizada em placas de 25 cm (LI-COR) e matriz de gel 6.5% KB^{PLUS™} (20 ml de gel, 150 µl de persulfato de amônio 10%, 15 µl de TEMED) em um LI-COR DNA Analyzer 4300 (1500 V, 40 W, 40 mA, 45 °C, velocidade de corrida 4).

As bandas diferencialmente expressas foram extraídas do gel, resuspendidas em Tampão TBE 1x (tampão de corrida) e reamplificadas com a mesma combinação de iniciador que a produziu e com uma base extra (A, T, C ou G) no iniciador MseI para evitar contaminação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A duração da fase de ninfas foi significativamente maior ($p < 0,01$) na variedade SP83-5073 (Figura 1A). Muitos trabalhos mostram que a duração da fase ninfal ou adulta é maior em genótipos resistentes devido, possivelmente, a mecanismos de antibiose ou deterrência alimentar (Suinaga et al., 2004; Caetano & Boiça Jr., 2000; Gervásio et al., 1999; Boiça Jr. et al., 1999). Os resultados da taxa de mortalidade (Figura 1B) reforçam essa hipótese, uma vez que a variedade

SP83-5073 apresentou médias significativamente maiores ($p < 0,01$). A contagem de ninfas no experimento de cDNA-AFLP aos 14 dias após a infestação também mostrou maior mortalidade de ninfas na variedade SP83-5073 (80% contra 20% na SP80-1816).

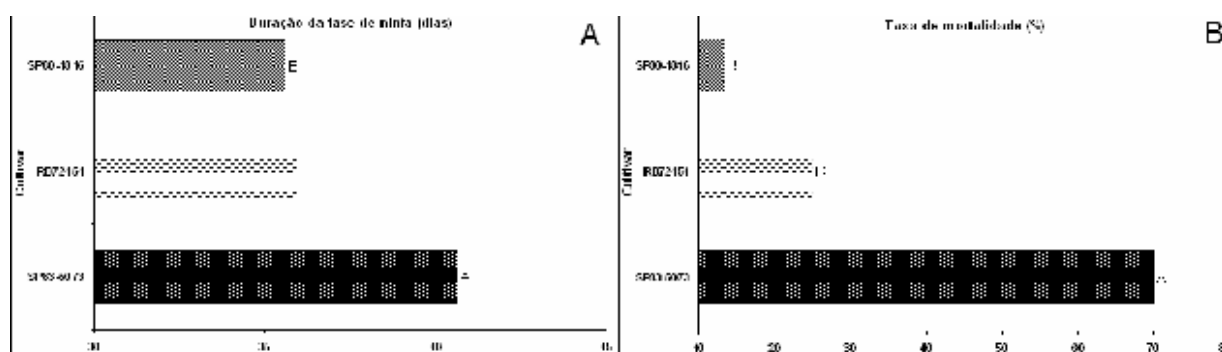


Figura 1. Taxa de mortalidade de ninfas e duração da fase ninfal em três variedades. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diversas substâncias tóxicas ou que causam deterrência alimentar, tais como inibidores de proteinase, compostos fenólicos e terpenos estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas. Alguns desses compostos são constitutivos, enquanto outros necessitam de estímulos externos para serem produzidos (Buchanan et al., 2000).

Um trabalho anterior, conduzido por França et al. (2001) objetivou identificar genes relacionados ao metabolismo secundário na cana-de-açúcar e o padrão de expressão de enzimas regulatórias. Os autores relataram que as vias de metabolismo de isopropanóides e fenilpropanóides são ativadas em diferentes estágios de desenvolvimento, tecidos e situações de estresse.

As principais vias envolvidas na síntese de compostos de defesa são a do ácido chiquímico, responsável pela produção de compostos fenólicos e indiretamente pela produção de compostos secundários nitrogenados, a do ácido

mevalônico, produtora de alguns compostos fenólicos e terpenos, e a do metil-D-eritritol 4-P (MEP), produtora de terpenos (Taiz & Zeiger, 2004).

A infestação de cigarrinhas afetou a massa seca e fresca de colmos, o diâmetro e altura de colmos (Tabelas 2 e 3; Figuras 2C e 2D). Este resultado corrobora com trabalhos anteriores (Dinardo-Miranda et al., 2006a; Cruz-Llanas et al., 2005; Dinardo-Miranda et al., 2002; Dinardo-Miranda et al., 1999) que relatam perdas significativas de produtividade de colmos em cana-de-açúcar atacada por cigarrinhas. As ninfas de cigarrinha-das-raízes alimentam-se principalmente de seiva do xilema, o que possivelmente resulta em deficiência hídrica e de nutrientes e consequentemente, em distúrbios metabólicos generalizados (Dinardo-Miranda et al., 2004; Gallo et al., 2002; Fewkes, 1969). Além disso, sob deficit hídrico, a taxa fotossintética é reduzida dramaticamente, comprometendo o crescimento e desenvolvimento da planta. (Taiz & Zeiger, 2004). Com a infestação, as plantas secam e morrem (Gallo et al., 2002).

A análise de crescimento demonstrou diferenças varietais. As menores médias para massa fresca e altura de colmos foram encontrados na variedade RB72454, Os colmos mais finos foram encontrados na variedade SP80-1816, não significativamente diferentes da RB72454.

Todos os parâmetros de crescimento apresentaram aumento ao longo do tempo, que é uma consequência do crescimento das plantas. Não foi detectada variação no diâmetro de colmos ao longo das épocas, provavelmente porque a primeira coleta foi realizada quando as plantas já tinham quase 100 dias de idade. Embora não haja interação significativa entre a infestação de *M. fimbriolata* e as épocas de coleta, a redução na massa fresca e seca de folhas aos 68 DAI pode ser devido ao estresse hídrico causado pela alimentação das ninfas, limitando a taxa fotossintética.

As menores médias de massa fresca e seca de raízes observadas na variedade SP83-5073 (Tabelas 2 e 3) provavelmente não estão envolvidas na maior duração da fase ninfal e taxa de mortalidade nessa variedade, uma vez que

no momento da infestação, quando a massa fresca de raízes era em média 114 g, as ninfas foram capazes de se alimentar e desenvolver.

Silva et al. (2005) demonstraram que as ninfas foram capazes de se desenvolver normalmente e produzir fortes sintomas em plantas mais jovens que as utilizadas nesse experimento, as quais provavelmente possuíam menor massa de raízes. Entretanto, a existência de diferenças morfológicas nessa variedade que possa afetar a alimentação de *M. fimbriolata* não pode ser descartada. Apesar de fornecermos evidências de mecanismos de antibiose da SP83-5073 contra a cigarrinha-das-raízes, pode existir uma combinação com a morfologia das raízes que reforça a resistência.

A menor massa fresca de colmos das variedades SP80-1816 e RB72454 pode ser decorrente do ataque da praga (Figura 2A), uma vez que essas variedades já foram relatadas como suscetíveis (Silva et al., 2005; Dinardo-Miranda, 2004; Dinardo-Miranda et al., 1999). A figura 2A também demonstra que o ataque de *M. fimbriolata* não teve efeito sobre a massa fresca de colmos na variedade SP83-5073, corroborando com os indícios de resistência fornecidos pela mortalidade de ninfas e duração da fase ninfal.

Dinardo-Miranda (2004) relata que em condições de campo a variedade RB72454 apresenta menor infestação que a SP80-1816. Essa menor infestação pode ser devida a não-preferência da cigarrinha por esse genótipo. Experimentos com chance de escolha são necessários para confirmar essa hipótese.

A figura 2B mostra que a massa fresca da variedade SP83-5073 superou as demais ao longo do tempo quando submetida à infestação de *M. fimbriolata*, o que pode ser resultado de mecanismos de antibiose ou morfologia de raízes, que inibiram a alimentação e crescimento das ninfas.

Tabela 2 – Resultado do teste de Tukey para massa fresca (g) de colmos, folhas e raízes e diâmetro de colmos (mm).

Causas da variação	Massa fresca (g)			Diâmetro de colmos (mm)
	Colmos	Folhas	Raízes	
Variedades (V)				
1. SP80-1816	111,50 AB	58,53 A	191,37 A	15,64 B
2. RB72454	103,40 B	63,32 A	189,85 A	15,85 AB
3. SP83-5073	122,53 A	61,60 A	145,27 B	16,95 A
Teste F (V)	5,89**	1,57 ^{ns}	7,16 **	4,11 *
DMS Tukey 5%	13,53	6,64	33,47	1,18
Níveis de infestação (I)				
1. Testemunha	122,53 A	62,31 A	165,89 A	16,82 A
2. 10 ninfas por planta	102,42 B	59,98 A	185,11 A	15,48 B
Teste F (I)	19,40 **	1,08 ^{ns}	2,89 ^{ns}	11,25 **
DMS Tukey 5%	9,19	4,50	22,73	0,80
Épocas de Amostragem (E)				
1. 8 DAI	51,37 C	58,24 BC	113,92 C	16,50 A
2. 17 DAI	111,30 B	69,44 A	124,60 C	16,45 A
3. 39 DAI	138,43 A	62,93 AB	176,99 B	15,60 A
4. 68 DAI	148,80 A	53,98 C	286,48 A	16,03 A
Teste F (E)	91,57**	8,75 **	48,81 **	1,13 ^{ns}
DMS Tukey 5%	17,19	8,43	42,55	1,50
V x I	4,27 *	1,37 ^{ns}	0,69 ^{ns}	1,67 ^{ns}
V x E	6,31 **	0,81 ^{ns}	1,16 ^{ns}	2,69 *
I x E	13,09 **	1,15 ^{ns}	0,35 ^{ns}	5,69 **
V x I x E	4,25 **	0,25 ^{ns}	1,06 ^{ns}	1,08 ^{ns}
CV %	17,23	15,55	27,32	10,50

DAI = Dias após a infestação; Letras maiúsculas comparam medias verticalmente pelo teste de Tukey; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ns = não-significativo.

Tabela 3 – Resultado do teste de Tukey para massa seca (g) de colmos, folhas e raízes e altura de colmos (cm).

Causas de variação	Massa seca (g)			Altura de
	Colmos	Folhas	Raízes	Colmos (cm)
Variedades (V)				
1. SP80-1816	12,83 A	14,35 A	47,61 A	69,31 A
2. RB72454	14,06 A	15,96 A	47,30 A	63,11 B
3. SP83-5073	12,67 A	14,47 A	33,75 B	73,33 A
Teste F (V)	0,95 ^{ns}	1,62 ^{ns}	6,42 ^{**}	9,99 ^{**}
DMS Tukey 5%	2,66	2,41	10,68	5,57
Níveis de infestação (I)				
1. testemunha	14,66 A	16,11 A	41,47 A	71,81 A
2. 10 ninfas por planta	11,71 B	13,74 B	44,30 A	65,35 B
Teste F (I)	10,84 ^{**}	8,51 ^{**}	0,61 ^{ns}	11,83 ^{**}
DMS Tukey 5%	1,80	1,63	7,25	3,78
Épocas de Amostragem (E)				
1. 8 DAI	5,87 C	15,96 A	40,55 B	58,15 C
2. 17 DAI	12,60 B	17,07 A	40,04 B	63,94 BC
3. 39 DAI	14,39 B	15,20 A	39,76 B	67,64 B
4. 68 DAI	19,89 A	11,48 B	67,19 A	84,61 A
Teste (E)	41,54 ^{**}	8,88 ^{**}	24,87 ^{**}	36,60 ^{**}
DMS Tukey 5%	3,38	3,06	13,57	7,07
V x I	3,08 ^{ns}	3,62 *	0,08 ^{ns}	1,43 ^{ns}
V x E	1,29 ^{ns}	1,42 ^{ns}	1,99 ^{ns}	5,38 ^{**}
I x E	4,03 *	0,57 ^{ns}	0,29 ^{ns}	6,71 ^{**}
V x I x E	1,48 ^{ns}	0,91 ^{ns}	0,73 ^{ns}	3,19 *
CV (%)	28,86	23,10	35,66	11,63

DAI = Dias após a infestação; Letras maiúsculas comparam medias verticalmente pelo teste de Tukey; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ns = não-significativo.

Houve uma tendência de diminuição da altura e diâmetro de colmos na SP80-1816 e RB72454 ao longo do tempo, provavelmente devido à infestação de *M.fimbriolata*, enquanto o oposto foi observado para a SP83-5073 (Figuras 3A e 3B). Juntamente com os resultados já discutidos, parece razoável admitir que essa variedade é resistente à cigarrinha-das-raízes.

Ao longo do tempo, a altura e diâmetro de colmos foram significativamente afetadas pela praga, corroborando com os sintomas de desidratação, colmos finos e “chochos” e morte da planta descritos por Macedo & Macedo (2004) e Gallo et al. (2002).

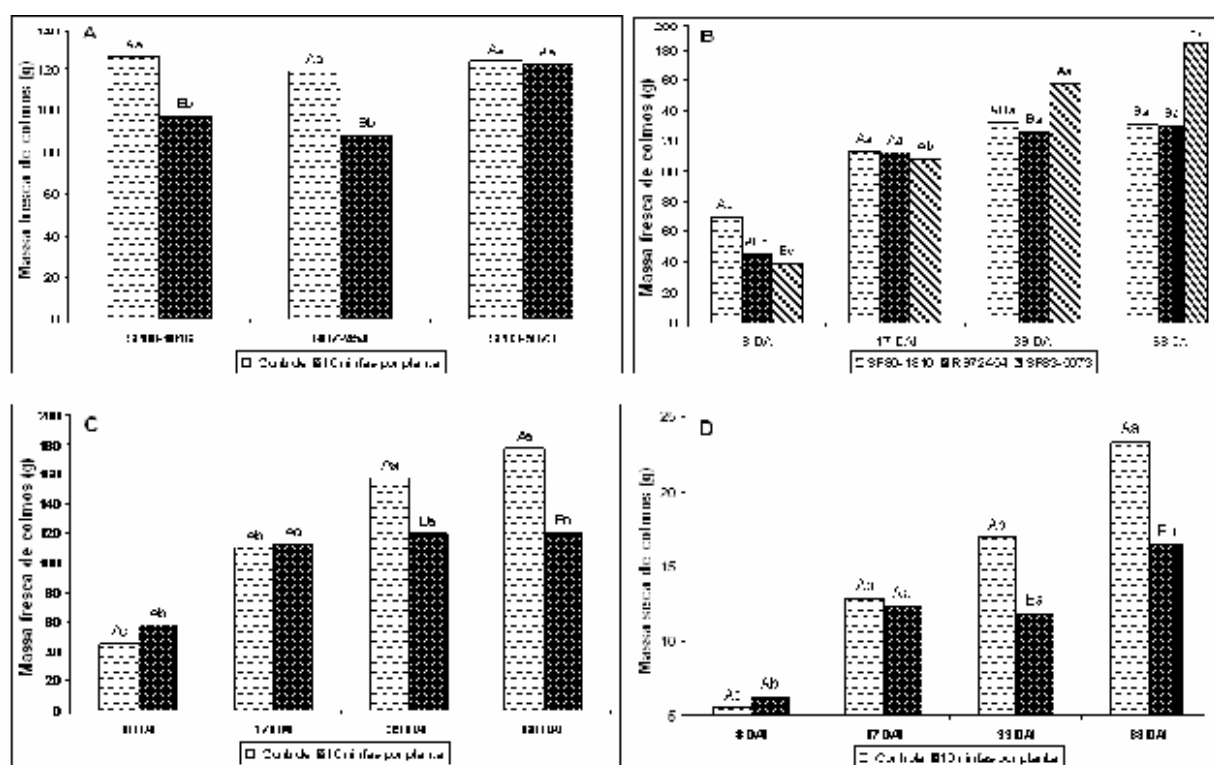


Figura 2. Massa fresca e seca de colmos. A – Efeito dos níveis de infestação dentro de variedades; B – Efeito de variedades dentro das épocas; C, D – Efeito dos níveis de infestação dentro das épocas. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam medias dentro dos tratamentos e letras minúsculas comparam médias dentro de tratamentos.

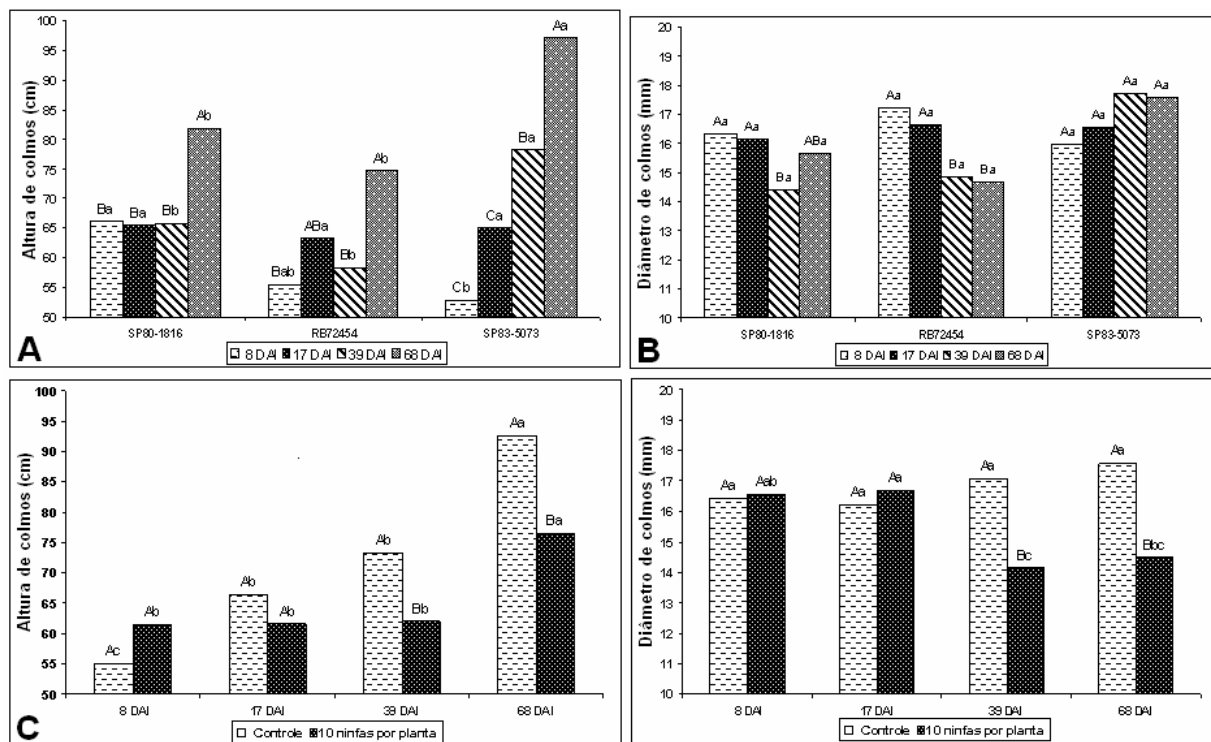


Figura 3. Altura e diâmetro de colmos. A, B – Efeito da época dentro de variedades; C, D – efeito dos níveis de infestação dentro de épocas. Letras maiúsculas comparam medias dentro dos tratamentos e letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos.

Análise de expressão diferencial

Quatro combinações de iniciadores foram escolhidas a partir das oito inicialmente testadas (Tabela 1). Poucos fragmentos diferencialmente expressos foram observados, mas na Figura 4 observamos bandas de aproximadamente 250 pb que foram expressas no genótipo resistente (combinação de iniciadores I) quando submetido à infestação de cigarrinha (poços 6 e 10, setas vermelhas). Essas bandas foram expressas somente na variedade SP83-5073, 24 e 48 horas após a infestação, o que indica que esses fragmentos podem estar envolvidos em mecanismos de defesa do genótipo resistente. Uma vez que foram expressos

pouco tempo após a infestação, é possível que esses fragmentos codifiquem proteínas relacionadas à patogênese. Essas proteínas estão relacionadas com mecanismos de interação planta-praga, e muitas vezes produzem resposta de defesa na planta hospedeira.

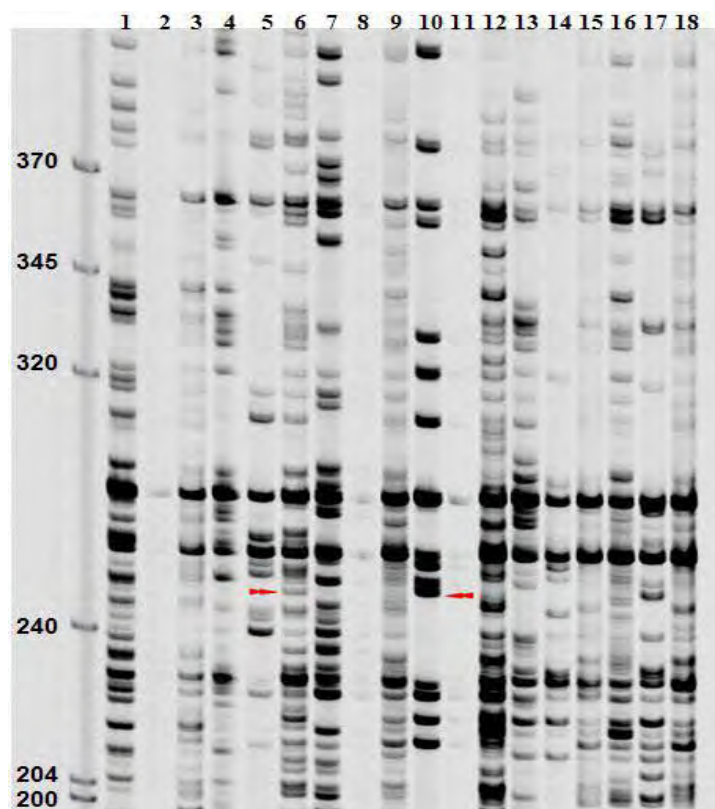


Figura 4. Foto do gel de cDNA-AFLP (combinação de iniciadores “I”) mostrando fragmentos (setas vermelhas) de 250 pb que foram diferencialmente expressos na variedade SP83-5073 atacada pela cigarrinha-das-raízes aos 24 e 48 horas após a infestação. *Descrição:* 1 – SP80-1816 antes da infestação; 2 – SP80-1816 1 dia após a infestação (testemunha); 3 – SP80-1816 1 dia após a infestação (infestada); 4 – SP83-5073 antes da infestação; 5 – SP83-5073 1 dia após a infestação (testemunha); 6 – SP83-5073 1 dia após a infestação (infestada); 7 – SP80-1816 2 dias após a infestação (testemunha); 8 – SP80-1816 2 dias após a infestação (infestada); 9 – SP83-5073 2 dias após a infestação (testemunha); 10 – SP83-5073 2 dias após a infestação (infestada); 11 – SP80-1816 7 dias após a infestação (testemunha); 12 – SP80-1816 7 dias após a infestação (infestada); 13 – SP83-5073 7 dias após a infestação (testemunha); 14 – SP83-5073 7 dias após a infestação (infestada); 15 – SP80-1816 14 dias após a infestação (testemunha); 16 – SP80-1816 14 dias após a infestação (infestada); 17 – SP83-5073 14 dias após a infestação (testemunha); 18 – SP83-5073 14 dias após a infestação (infestada).

As bandas diferencialmente expressas foram isoladas e estão sendo clonadas e preparadas para o sequenciamento. Devido aos fortes indícios de resistência observados na análise de crescimento, mortalidade do inseto e longevidade de ninfas, acredita-se que esses fragmentos podem de fato estar envolvidos com a resistência genética. Entretanto, se os resultados do sequenciamento demonstrarem que não existe relação desses fragmentos isolados com mecanismos de defesa, existe ainda a possibilidade de que a resistência seja promovida pela morfologia das raízes.

Parece improvável que o fragmento de 250 pb isolado neste trabalho seja um falso positivo, uma vez que duas plantas foram utilizadas para cada condição, e cada reação foi corrida ao menos oito vezes para confirmar a expressão.

Independentemente dos resultados de sequenciamento, estudos morfológicos são necessários para apontar se a antibiose é o único fator de resistência na variedade SP83-5073, uma vez que pode haver uma combinação com a morfologia das raízes que reforça a resistência.

CONCLUSÕES

Os resultados confirmam a suscetibilidade das variedades SP80-1816 e RB72454 à *Mahanarva fimbriolata*, e fornecem fortes indícios de que a variedade SP83-5073 é resistente à praga através de um mecanismo de antibiose. O fragmento de 250 pb isolado a partir dessa variedade pode estar relacionado com a defesa à cigarrinha-das-raízes.

REFERÊNCIAS

BACHEM, C.W.B.; OOMEN R.J.F.J.; VISSER, R.G.F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. **Plant Molecular Biology Reporter**, V.16, p.157–173, 1998.

BOIÇA JR., A.L.; LARA, F.M.; OLIVEIRA, J.C. Influence of passion fruit genotypes and larval density on the biology of *Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 1, 1999.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

CAETANO, A. C.; BOIÇA JR., A. L. Development of *Leptoglossus gonagra* Fabr. (Heteroptera: Coreidae) in passion fruit species. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, 2000.

DE LA CRUZ-LLANAS, J. J.; VERA-GRAZIANO, J.; LÓPEZ-COLLADO, J.; PINTO, V.M.; GARZA-GARCIA, R. Una técnica simple para el desarrollo de ninfas de *Aeneolamia postica* (Homoptera: Cercopidae). **Folia Entomologica Mexicana**, v. 44, n.1, p.91-93, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FIGUEIREDO, P.; LANDELL, M.G.A.; FERREIRA, J.M.G.; CARVALHO, P.A.M. Danos causados pelas cigarrinhas-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. **Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.17, n. 5, p.48-52, 1999.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FERREIRA, J.M.G.; DURIGAN, A.M.P.R.; BARBOSA, V. Eficiência de inseticidas e medidas culturais no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. **Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 18, n.3, p. 34-36, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; MOSSIN, G.C.; DURIGAN, A.M.P.R.; BARBOSA, V. Controle Químico de Cigarrinha-das-Raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em Cana-de-Açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.19, n.4, p.20-23, 2001 a.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GARCIA, V.; COELHO, A.L. Eficiência de Inseticidas no Controle da Cigarrinha das Raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em Cana-de-Açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.20, n.1, p.30-33, 2001 b.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GARCIA, V.; PARAZZI, V.J. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, v. 31, n.4, p. 909-914, 2002.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2003. 72 p.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. (Ed.) **Pragas de Solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa, 2004. p. 495-516.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; PIVETTA, J.P.; FRACASSO, J.V. Eficiência de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:Cercopidae) e seus efeitos sobre a qualidade e produtividade da cana-de-açúcar. **Bioassay**, v. 1, n. 5, p. 1-5, 2006 a.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Manejo de nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. In: MARQUES, M.O.; MUTTON, M.A.; AZANIA, A.A.P.M.; TASSO JUNIOR, L.C.; NOGUEIRA, G.A.; VALE, D.W. (Ed.) **Tópicos em tecnologia sucroalcooleira**. Jaboticabal: Multipress, 2006b. p. 121-139.

FEWKES, D.W. The biology of sugar cane froghoppers. In: WILLIAMS, J.R.; METCALFE, J.R.; MUNGOMERY, R.W.; MATHES, R. (Ed.) **Pests of sugar cane**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1969. p. 281-307.

FRANÇA, S. C; ROBERTO, P.G.; MARINS, M.A.; PUGA, R.D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J.O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n.1-4 p. 243-250, 2001.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA, J.F.; GRISOTO, E.; VENDRAMIM, J.D.; BOTELHO, P.S.M. Bioactivity of Neem, *Azadirachta indica*, Against Spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) on Sugarcane. **Journal of Economic Entomology**, vol. 99, n. 6, p. 2010 – 2014, 2006 a.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, 2006 b. Available on: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162006000400001&lng=pt&nrm=iso>. Accessed on October 28 2006. doi: 10.1590/S0103-90162006000400001.

GERVÁSIO, R.C.R.G; CIOCIOLA, A.I.; CECÍLIA, L.V.C.S.; MALUF, W.R. Aspectos biológicos de *Tuta absoluta* (meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em dois genótipos de tomateiro contrastantes quanto ao teor de 2-tridecanona nos folíolos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n. 2, p. 247-251, 1999.

MACEDO, N.; MACEDO, D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Visão agrícola**, v. 1, p. 38-46, 2004.

MENDONÇA, A.F.; BARBOSA, G.V.S.; MARQUES, E.J. As cigarrinhas da Cana-de-Açúcar (Hemiptera:Cercopidae) no Brasil. In: MENDONÇA, A.F. (ed.) **Pragas da Cana-de-Açúcar**. Maceió: Insetos & Cia. 1996. 200p.

MEYER, E.; NORRIS, C. P.; JACQUIN, E.; RICHARD, C.; SCANDALIARIS, J. The impact of green cane production systems on manual and mechanical farming operations. In: **CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS**, 25., 2005, Guatemala City. Proceedings... Guatemala City: D. M. Hogarth. 2005. p. 500-511.

SILVA, R.J.N., GUIMARÃES, E.R., GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; FERRO, M.I.T.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Infestation of froghopper nymphs changes the amounts of total phenolics in sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 6, p. 543-546, 2005. Available on: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162005000600005&lng=en&nrm=iso>. doi: 10.1590/S0103-90162005000600005.

SUINAGA, F.A.; PICANÇO, M.C.; MOREIRA, M.D.; SEMEÃO, A.A., MAGALHÃES, S.T.V. Resistência por antibiose de *Lycopersicon peruvianum* à traça do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n.2, p.281-285, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed editora, 3ª ed., 2004, 719 p.

THOMPSON, V. Associative nitrogen fixation, C4 photosynthesis, and the evolution of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) as major pests of neotropical sugarcane and forage grasses. **Bulletin of Entomological Research**, v. 94, p. 189–200, 2004.

CAPÍTULO III - ACÚMULO DE PROLINA EM CANA-DE-AÇÚCAR SOB ESTRESSE HÍDRICO OU SUBMETIDA AO ATAQUE DE CIGARRINHA-DAS-RAÍZES

RESUMO

A cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) tornou-se uma praga importante da cultura da cana-de-açúcar na região centro-sul do Brasil. Estratégias de controle têm sido desenvolvidas, mas os danos promovidos por essa praga e sua interação com a cana-de-açúcar ainda são pouco caracterizados. Em altos níveis de infestação da praga, os sintomas nas plantas são muito semelhantes à restrição hídrica severa. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar se o estresse promovido pela infestação de ninfas de cigarrinha-das-raízes resulta em acúmulo de prolina livre, além de comparar dois genótipos de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao déficit hídrico. Dois experimentos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4 com duas cultivares (SP80-1816 e RB72454), dois manejos (controle e 10 ninfas por planta ou 50% de restrição hídrica) e quatro épocas de amostragem. O déficit hídrico promovido por *M. fimbriolata* não resultou em acúmulo de prolina, ilustrando a existência de mecanismos distintos para a percepção do estresse hídrico promovido pela praga e pela variação no potencial osmótico nas células das raízes. A cultivar RB72454 acumula maiores teores de prolina livre, e o acúmulo de massa seca e o crescimento dos colmos são menos afetados nessa cultivar sob restrição hídrica. Os teores de solutos compatíveis provavelmente não podem ser utilizados para quantificar o estresse promovido por *M. fimbriolata* em cana-de-açúcar. A cultivar RB72454 é mais tolerante ao déficit hídrico do que a cultivar SP80-1816.

PALAVRAS-CHAVE: *Mahanarva fimbriolata*, acúmulo de prolina, *Saccharum* spp., déficit hídrico.

FREE PROLINE ACCUMULATION IN SUGARCANE UNDER WATER RESTRICTION AND SPITTLEBUG INFESTATION

ABSTRACT:

Mahanarva fimbriolata (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) has become a key pest in the sugarcane fields of center-south Brazil. Although some control technologies have shown to be efficient, the damage promoted by this spittlebug species and its interaction with sugarcane are poorly characterized. At high infestation rates the symptoms are similar to severe water restriction. This work was conducted to determine whether the stress promoted by spittlebug infestation can be measured in terms of free proline accumulation. We also compared water restriction tolerance in two sugarcane genotypes. Two experiments were set up in a greenhouse and arranged in completely randomized design in a 2 x 2 x 4 factorial, with two cultivars (SP80-1816 and RB72454), two stress levels (control and 10 nymphs per plant or 50% water restriction) and four sampling dates. The water deficit caused by spittlebug nymphs sucking xylem sap does not result in proline accumulation, illustrating that there are different mechanisms to sense when the water deficit is caused by insect feeding or water potential variation in root cells. The cultivar RB72454 accumulates more free-proline, and the dry mass accumulation and stalk growth are less affected in this cultivar under water restriction. The levels of compatible solutes probably cannot be used to measure spittlebug infestation stress in sugarcane and RB72454 is more tolerant to water shortage than SP80-1816.

KEY WORDS: *Mahanarva fimbriolata*, proline accumulation, *Saccharum* spp., water deficit.

INTRODUÇÃO

A cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) é uma praga que tem ganhado importância com a expansão da colheita mecanizada sem queima prévia de cana-de-açúcar. A camada de palha deixada no solo favorece o desenvolvimento das formas jovens e protege os ovos em diapausa.

A infestação de *M. fimbriolata* se correlaciona positivamente com alta precipitação e temperatura do solo condições que ocorrem de novembro a abril no estado de São Paulo, onde a cigarrinha-das-raízes é uma das pragas-chave da cana-de-açúcar (Gallo et al., 2002).

As ninfas alimentam-se principalmente do xilema das raízes, ocasionando deficiência nutricional e hídrica e distúrbios metabólicos generalizados (Gallo et al., 2002).

Estudos recentes concordam que o dano principal, isto é, a seca de colmos, tornando-os ocos, como observado em condições de restrição hídrica severa é causado pelas ninfas (Dinardo-Miranda, 2004; Silva et al., 2005; Garcia et al., 2006).

Quando as plantas se submetem a condição de déficit hídrico, um aumento na concentração de solutos compatíveis previne a perda de água pela redução do potencial osmótico e conseqüente manutenção do potencial hídrico em níveis ótimos. A prolina, glicina-betaína e açúcares são exemplos de solutos compatíveis envolvidos no ajuste osmótico, permitindo tolerância à seca e garantindo a integridade membranar sem afetar as funções protéicas (Bray, 1993; 1997; Taiz & Zeiger, 2004).

Devido à similaridade entre os sintomas da infestação de *M. fimbriolata* e da restrição hídrica, é possível que solutos compatíveis sejam acumulados sob ataque de cigarrinha-das-raízes. Dessa maneira, a medição da concentração desses compostos poderia fornecer uma idéia do nível de estresse que seria útil em estudos de resistência à praga. O efeito combinado da infestação de *M. fimbriolata* e deficit hídrico no acúmulo de prolina não seria uma grande preocupação, já que a ocorrência das cigarrinhas está condicionada à precipitação

abundante, especialmente no fim da primavera e durante todo o verão na região centro-sul do Brasil.

Este trabalho foi conduzido para determinar se existe correlação entre a infestação de *M. fimbriolata* e o acúmulo de prolina livre em cana-de-açúcar, e se o teor desse aminoácido pode ser utilizado em estudos de resistência para determinar a tolerância de variedades à praga. Além disso, comparamos a resistência à seca de dois genótipos de cana-de-açúcar em termos de acúmulo de prolina livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Um experimento sem chance de escolha e um experimento de restrição hídrica foram conduzidos em casa de vegetação localizada no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, sob condições de temperatura e umidade controladas (22 a 33°C; umidade relativa de 50 a 60%). Mini-toletes de uma gema das variedades SP80-1816 e RB72454 foram plantados em bandejas de isopor de 64 (5 x 10 cm) contendo o substrato comercial Plantmax® HT (Eucatex).

O experimento de restrição hídrica foi conduzido para verificar como a infestação de cigarrinha-das-raízes se correlaciona com a falta de água no solo.

Aos 27 dias após o plantio (DAP) as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 15 litros contendo solo de textura média, corrigido e fertilizado, na quantidade de uma plântula por vaso. Os vasos foram irrigados diariamente até a capacidade de campo.

O experimento com cigarrinhas foi arranjado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4 com dois genótipos de cana-de-açúcar, dois níveis de infestação (controle e 10 ninfas/planta), e quatro épocas de amostragem (8, 17, 39 e 68 dias após a infestação). O mesmo delineamento foi utilizado no experimento de restrição hídrica, e os fatores representaram dois

genótipos de cana-de-açúcar, dois níveis de restrição hídrica (controle e 50% de disponibilidade hídrica) e quatro épocas de amostragem (cinco dias antes da restrição hídrica e 21, 48 e 91 dias após). Quatro repetições foram utilizadas em ambos os ensaios. Os dados foram submetidos à análise de variância e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Criação e infestação de cigarrinhas

Para manter a umidade do solo e estabilizar a temperatura para futura infestação de cigarrinha-das-raízes os vasos foram cobertos com 65 g de folhas e pontas picadas e secas de cana-de-açúcar (70-80% de massa seca, correspondendo a 9 t ha⁻¹), simulando a palha que fica no campo após a colheita, 17 dias antes da infestação.

As ninfas foram criadas como descrito por Garcia et al. (2006). A infestação de ninfas de 21 dias de idade foi realizada aos 94 DAP, com auxílio de um pincel n. 4, nos níveis: 0 (testemunha) e 10 ninfas por planta. A espuma foi transferida abundantemente com as ninfas para garantir a sobrevivência das mesmas após a infestação.

Os vasos foram cobertos com tela de náilon para isolar o efeito dos adultos sugadores de folha e evitar a migração de ninfas (teste sem chance de escolha). A presença de adultos foi monitorada diariamente e os indivíduos encontrados eram contados e imediatamente mortos. O efeito dos adultos não foi estudado para evitar novas oviposições que resultariam em variação indesejável. Além disso, de acordo com Dinardo-Miranda (2004) o dano mais importante da praga é causado pela alimentação das formas jovens.

Restrição hídrica

As plantas foram irrigadas diariamente até a capacidade de campo até os 94 DAP para garantir crescimento inicial adequado. Um atmômetro foi utilizado para estimar a evapotranspiração diária e as plantas foram submetidas a 50% de

restrição hídrica através da irrigação de apenas metade da evapotranspiração do dia anterior (Broner & Law, 1991).

Quantificação de prolina livre

Folhas de cana-de-açúcar (+1, sistema de Küijper) foram coletadas aos 8, 17, 39 e 68 dias após a infestação (DAI) e aos 5 dias antes da restrição hídrica e 21, 48 e 91 dias após. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido para melhorar a extração da prolina livre. Os níveis de prolina foram determinados conforme descrito por Bates et al. (1973). Os resultados foram expressos em μmols de prolina por grama de massa fresca, através da fórmula:

$$[(\mu\text{g prolina ml}^{-1} \times 4 \text{ ml}^{**})/115.5 \mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}]/[(\text{g amostra})/5]$$

*** volume de tolueno.*

Análise de massa seca, altura e diâmetro de colmos

O acúmulo de massa seca, altura e diâmetro de colmos foram determinados com o objetivo de verificar se os estresses seriam eficientes para promover redução de crescimento.

A altura de plantas foi medida do solo até a primeira auricular visível com uma trena, enquanto o diâmetro foi medido com um paquímetro na porção mediana do colmo.

As plantas foram divididas em folhas, colmos e raízes, e secas em estufa com circulação forçada de ar a 70°C até o peso constante. A massa seca foi determinada em balança eletrônica com precisão de miligramas. Para remover partículas remanescentes de solo, as raízes foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha. Após a pesagem, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A massa seca de folhas, colmos e raízes (Figura 3) foi afetada pela infestação de ninfas de *M. fimbriolata* em ambas variedades ($P \leq 0.01$). A mortalidade de ninfas foi inferior a 20% em ambos os genótipos e não houve diferença significativa entre os mesmos, o que indica que ambos são suscetíveis à praga (Guimarães et al., 2007).

A infestação de cigarrinhas não resultou em acúmulo de prolina livre em tecidos foliares de cana-de-açúcar e não houve diferença entre variedades ou épocas de amostragem ao longo do primeiro experimento (Figura 1, Figura 2A).

Streck (2004) discute os mecanismos de percepção do estresse hídrico pelas plantas. Em sua revisão, o autor demonstra que as hipóteses mais aceitas são a dos sinais hidráulicos que são enviados à parte aérea e da sinalização molecular a partir das raízes, porém ainda há contradição sobre o assunto e detalhes sobre os mecanismos de percepção da restrição hídrica ainda não estão claros.

O fato de que o sintoma de murcha de plantas ocasionado por ninfas de *M. fimbriolata* não resulta em acúmulo de prolina livre ilustra que existem mecanismos diferentes para a percepção da deficiência hídrica ocasionada pelo inseto e aquela ocasionada pela falta de água no solo, levando a variação de potencial osmótico nas células das raízes. A alimentação de ninfas de cigarrinha-das-raízes é responsável pela seca da parte aérea e possivelmente resulta em sinais hidráulicos que estimulam o fechamento estomático. Portanto, é possível que próprios sinais hidráulicos per si não estejam envolvidos com o acúmulo de solutos compatíveis. Por outro lado, o acúmulo de prolina livre em plantas submetidas à restrição hídrica (Figura 2A) ilustra que a sinalização molecular a partir das raízes está envolvida no ajuste osmótico.

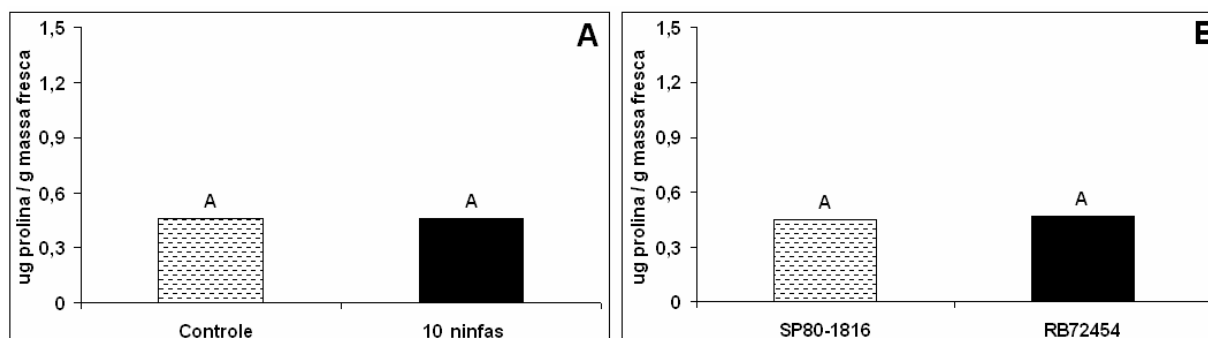


Figura 1 – Níveis de prolina livre no experimento de cigarrinha-das-raízes. Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A – Efeito da infestação; B – Efeito das variedades de cana-de-açúcar.

Em condição hídrica ideal, o pH da seiva xilemática é mais baixo, enquanto que sob restrição hídrica é mais elevado. Quando o conteúdo xilemático é mais básico, o ácido abscísico (ABA) se desprotona e não é capaz de atravessar a membrana das células do mesofilo, acumulando-se nas células-guarda e estimulando o fechamento estomático (Taiz & Zeiger, 2004). Dessa forma, espera-se que tanto a infestação de cigarrinhas como a restrição hídrica no solo promovam fechamento estomático, já que limitam o fluxo de água para a parte aérea. Os resultados aqui apresentados indicam que a sinalização molecular a partir das raízes exerce papel importante na distinção de quando a restrição hídrica nas plantas é promovida pela falta de água no solo ou por insetos sugadores (Figura 2A).

A variedade RB72454 acumula mais prolina livre (Figura 2), e o acúmulo de massa seca, altura e diâmetro de colmos são menos afetados pela restrição hídrica nessa variedade (Figuras 3 e 4). Esses resultados indicam que o genótipo é mais tolerante ao déficit hídrico que o do SP80-1816.

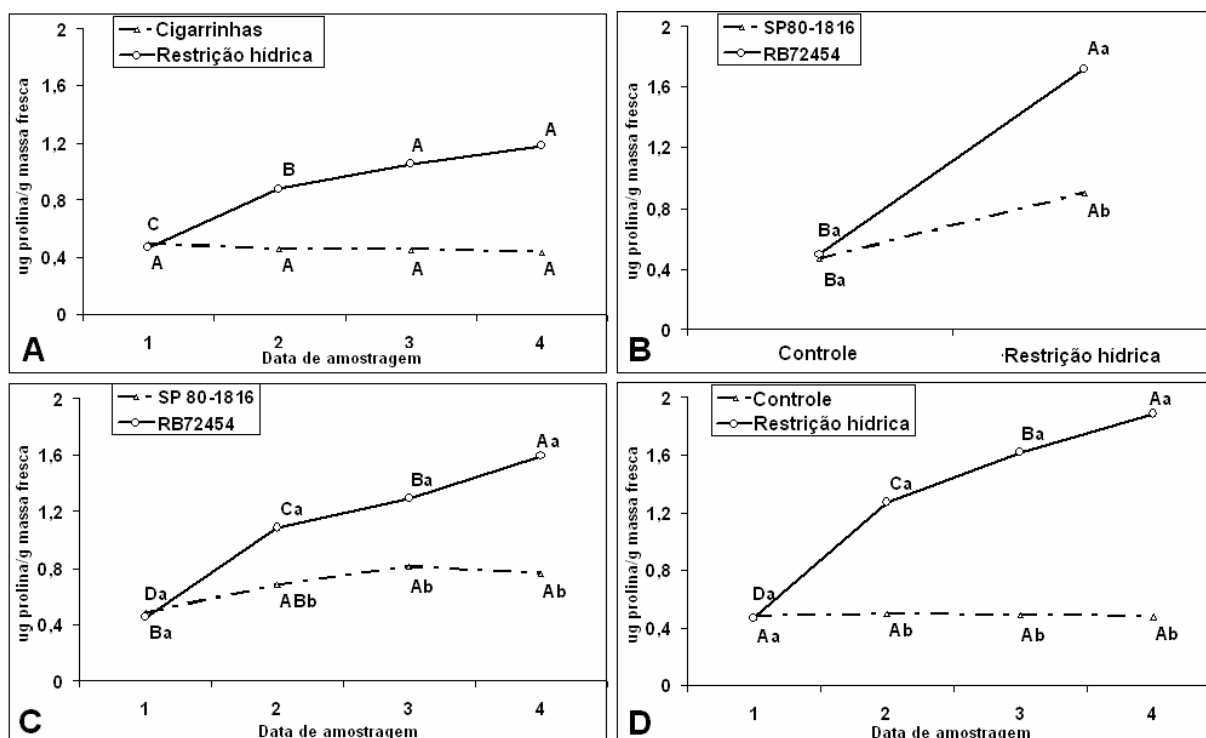


Figura 2 – Teores de prolina livre (experimento de restrição hídrica). A – Comparação entre a infestação de cigarrinhas e a restrição hídrica ao longo do experimento; B – Efeito das variedades de cana-de-açúcar; C – Variedades ao longo do experimento; D – Efeito da restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam medias dentro de tratamentos e minúsculas compram medias entre tratamentos.

Uma das mais estudadas respostas de plantas ao deficit hídrico é o acúmulo de prolina livre, e muitos trabalhos relatam uma importante correlação entre o acúmulo desse aminoácido e a tolerância à seca (Nepomuceno et al., 2001; Marin et al., 2006). Muitas outras funções que indiretamente auxiliam as plantas a tolerar a falta de água têm sido atribuídas ao acúmulo de prolina, e.g. estabilização de estruturas sub-celulares, o combate a radicais livres, armazenamento energético e sinalização molecular em condições de estresse (Bartels & Sunkar, 2005).

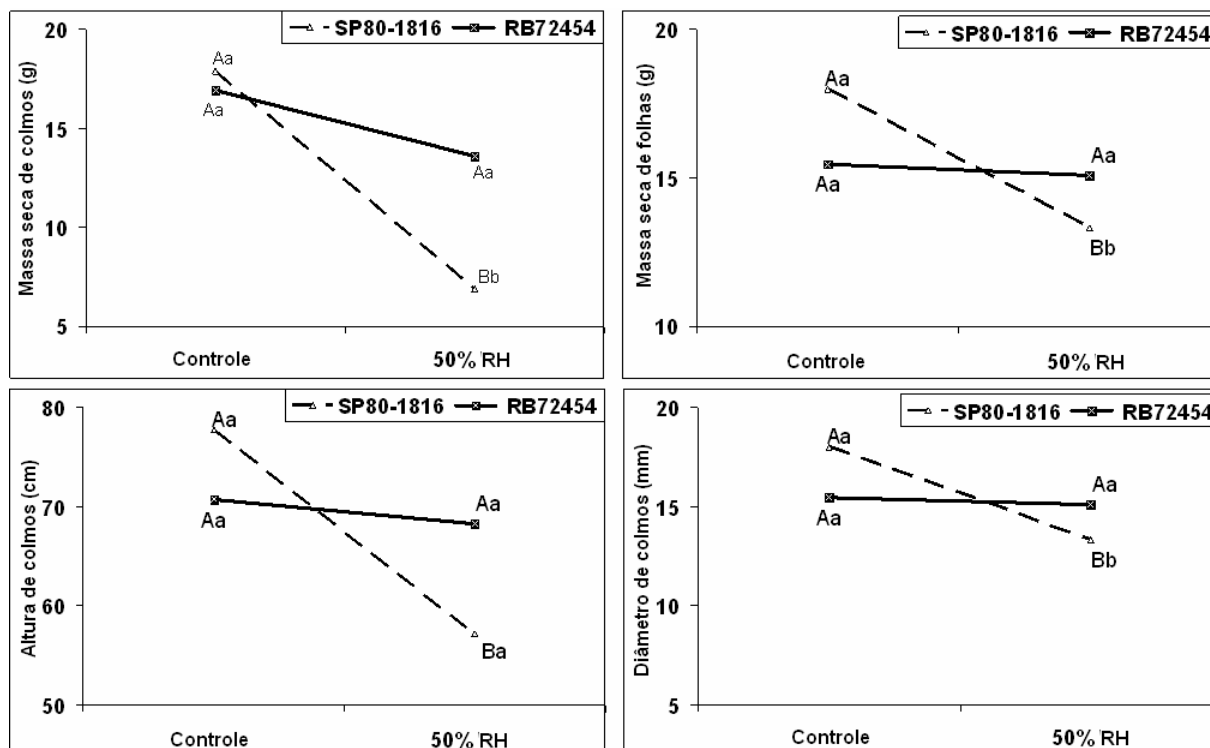


Figura 3 – Acúmulo de massa seca, altura e diâmetro de colmos no experimento de restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam médias dentro de tratamentos e minúsculas comparam médias entre tratamentos. *RH* = restrição hídrica.

A prolina é sintetizada a partir de glutamato e pirrolina-5-carboxilato (P5C) através de sucessivas reduções catalizadas pela pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS) e da pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR). Pode ainda ser produzida a partir da ornitina pela ornitina d-aminotransferase (OAT). O acúmulo de prolina depende ainda de sua catálise pela prolina desidrogenase (ProDH), e P5C desidrogenase (P5CDH) (Hare et al., 1999). Sob déficit hídrico, a prolina parece ser sintetizada principalmente pela via do glutamato (Bartels & Sunkar, 2005).

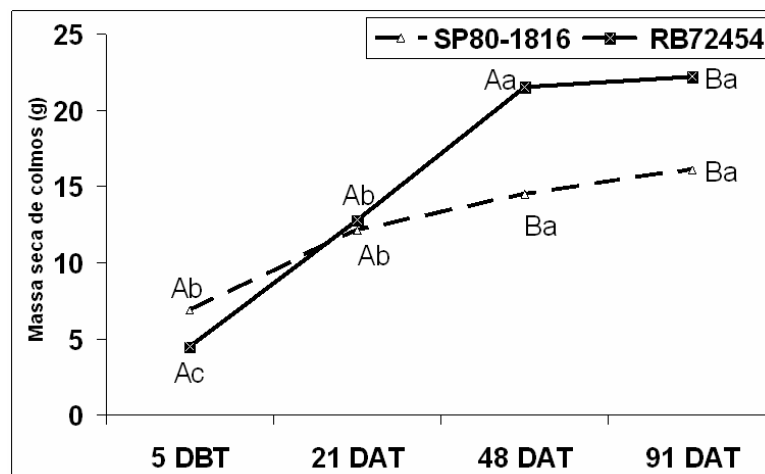


Figura 4 – Comparação das variedades de cana-de-açúcar ao longo do experimento de restrição hídrica. DBT – Dias antes do início da restrição hídrica; DAT – Dias após o início da restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam medias dentro de tratamentos e minúsculas comparam medias entre tratamentos.

A expressão da redutase (P5CR) é regulada por variações de potencial osmótico no citoplasma (Williamson & Slocum 1992). A redução do potencial osmótico induz a biossíntese da P5C, resultando em produção de prolina. O acúmulo de prolina livre em células vegetais submetidas a estresse hídrico é atribuído a um mecanismo de ajuste osmótico (Delauney & Verma, 1993).

Tanto a infestação de cigarrinha como a restrição hídrica reduziram o acúmulo de massa seca e o crescimento de colmos, e o aspecto geral das plantas submetidas aos dois tipos de estresse mostrou-se de fato muito semelhante. No entanto, o acúmulo de prolina livre não aumentou com a infestação de cigarrinhas, possivelmente porque uma variação de potencial osmótico é necessária para a biossíntese de P5C. E as ninfas de *M. fimbriolata* alimentam-se diretamente da seiva do xilema (e parcialmente do floema) (Fewkes, 1969; Mendonça & Mendonça, 2005), o que não deve causar variação de potencial osmótico nas células das raízes. Embora os solutos compatíveis ajam sinergisticamente na promoção da tolerância ao estresse hídrico, a prolina livre é um dos osmoprotetores mais rapidamente acumulados. Portanto, é possível que outros

solutos compatíveis igualmente não possam ser utilizados para medir o estresse promovido por ninfas de cigarrinha-das-raízes.

O déficit hídrico ocasionado pelas ninfas sugadoras de xilema não resulta em acúmulo de prolina, ilustrando a existência de mecanismos distintos para a percepção de quando a restrição hídrica é causada pela infestação do inseto ou pela variação de potencial hídrico nas células das raízes. Isso indica que o teor de solutos compatíveis não pode ser utilizado para medir o estresse causado por *M. fimbriolata*.

Tanto a infestação de cigarrinhas como a restrição hídrica reduzem o acúmulo de massa seca e o crescimento de colmos ocasionando sintomas semelhantes.

A variedade RB72454 acumula mais prolina livre e seu crescimento é menos afetado pela restrição hídrica que a variedade SP80-1816, o que sugere que a primeira é mais tolerante à seca.

REFERÊNCIAS

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n.1, p.23-58, 2005.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207, 1973.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p.1035-1040,1993.

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**. v.2, p.48-54, 1997.

BRONER, I.; LAW, R.A.P. Evaluation of a modified atmometer for estimating reference ET. **Irrigation Science**, v.12, p.21-6, 1991.

DELAUNEY, A.; VERMA, D. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant Journal**, v. 4, p.215-223, 1993.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. (Ed.) **Pragas de Solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa, 2004. p. 495-516.

FEWKES, D.W. The biology of sugar cane froghoppers. In: WILLIAMS, J.R.; METCALFE, J.R.; MUNGOMERY, R.W.; MATHES, R. (Ed.) **Pests of sugar cane**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1969. p. 281-307.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, 2006.

GUIMARÃES, E.R.; MUTTON, M.A.; FERRO, M.I.T.; SILVA, J.A.; MUTTON, M.J.R.; KALAKI, D.B.; MADALENO, L.L. Evidence of sugarcane resistance against *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Proceedings of the XXVI ISSCT Congress**, Durban, 2007.

HARE, P.; CRESS, W.; STADEN, J. van. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.413-434, 1999.

MARIN, A.; SANTOS, D.M.M.; BANZATTO, D.A.; CODOGNOTTO, L.M. Influência da disponibilidade hídrica e acidez do solo nos teores de prolina livre de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.355-358, 2006.

MENDONÇA, A.F.; MENDONÇA, I.C.B.R. Cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* (Hemíptera: Cercopidae). In: MENDONÇA, A.F. (Ed.) **Cigarrinhas da cana-de-açúcar. Controle biológico**. Maceió: Insecta, 2005. cap. 3, p. 95-200.

NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 23, p.12-18, 2001.

SILVA, R.J.N., GUIMARÃES, E.R., GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; FERRO, M.I.T.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Infestation of froghopper nymphs changes the amounts of total phenolics in sugarcane. **Scientia agricola**, v. 62, n. 6, p. 543-546, 2005.

STRECK, N.A. Do we know how plants sense a drying soil? **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed editora, 3ª ed., 2004, 719 p.

WILLIAMSON, C. L.; SLOCUM, R. D. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the 1-pyrroline-5-carboxylate reductase (proC) gene in Pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v. 100, p. 1464-1470, 1992.

CAPÍTULO IV - NÍVEIS CONSTITUTIVOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS PODEM ESTAR RELACIONADOS À RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR A CIGARRINHA-DAS-RAÍZES

RESUMO

A interação da cigarrinha-das-raízes com a cana-de-açúcar é ainda pouco caracterizada e existem poucas informações sobre variedades resistentes. Os compostos fenólicos estão envolvidos em mecanismos de resistência do tipo antibiose, mas poucos trabalhos se dedicam ao estudo do papel desses compostos na interação das plantas com insetos sugadores. O trabalho foi conduzido para determinar como a cana-de-açúcar responde à infestação de *M. fimbriolata* em termos de acúmulo de compostos fenólicos. Um experimento foi instalado em condições controladas, em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 4, com 3 genótipos e cana-de-açúcar, 2 níveis de infestação de ninfas de *M. fimbriolata* e 4 épocas de amostragem, com 4 repetições. Os genótipos SP 80-1816 e RB 72454 apresentaram maiores níveis de fenóis totais quando submetidos à infestação da praga, mas a duração da fase ninfal e a mortalidade das cigarrinhas foram significativamente menores nessas variedades, indicando que o aumento na concentração de compostos fenólicos pode ter sido causado pela morte e apodrecimento das raízes. Não foi observada variação nos níveis de fenóis totais na variedade SP 85-5073 submetida à infestação de *M. fimbriolata*. Entretanto, a mortalidade da cigarrinha-das-raízes e a duração da fase de ninfas foram significativamente maiores nesse genótipo, indicando a existência de resistência do tipo antibiose. Análises de correlação indicaram que maiores teores iniciais de compostos fenólicos resultam em mortalidade da praga e pode aumentar a duração da fase de ninfa.

PALAVRAS-CHAVE: *Mahanarva fimbriolata*, interação planta-praga, *Saccharum* spp., antibiose.

CONSTITUTIVE LEVELS OF PHENOLIC COMPOUNDS MAY BE ASSOCIATED TO THE RESISTANCE OF SUGARCANE TO SPITTLEBUGS

ABSTRACT

The spittlebug species *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) has caused significant yield losses to sugarcane fields of center-south Brazil. However, the interaction of this pest with sugarcane is poorly characterized and little is known about varietal resistance. Phenolic compounds have been reported to be involved in antibiosis resistance mechanisms, but few works are dedicated to study their roles in the interaction of the host plant with sucking insects. We determined how sugarcane responds to spittlebug infestation in terms of total phenolics, and correlations between spittlebug biology parameters and the levels of phenolic compounds are shown. An experiment was conducted in controlled conditions and arranged in completely randomized design, in a 3 X 2 X 4 factorial with three sugarcane genotypes, two infestation levels and four sampling dates. Three replications were used. The genotypes SP80-1816 and RB72454 accumulate phenolic compounds in response to spittlebug infestation, and nymph mortality and the duration of nymph phase were significantly lower in these varieties. These results indicate that in susceptible cultivars the increase in total phenolics may be due to the damage caused by spittlebug feeding. No variation was detected in the levels of total phenolics in SP83-5073 under spittlebug infestation, but the constitutive levels of phenolics in this genotype are significantly higher. Spittlebug mortality and duration of nymph phase were significantly higher in this variety, indicating that there may be an antibiosis mechanism providing some resistance to the pest.

KEY WORDS: *Mahanarva fimbriolata*, plant-pest interaction, *Saccharum* spp., antibiosis.

INTRODUÇÃO

A colheita de cana-de-açúcar sem a queima prévia da palha tem crescido ano após ano no Brasil. A 'cana crua' é geralmente colhida mecanicamente, e deixa uma camada de palha sobre o solo que favorece a ocorrência de algumas espécies de insetos-praga e plantas daninhas, ao passo que reduz drasticamente a ocorrência de outras, especialmente as fotoblásticas positivas.

A cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) é um exemplo de praga que tem ganho importância com o sistema de colheita de 'cana crua'. As fêmeas adultas ovipositam sob o colchão de palha, próximo à base dos colmos. Quando as ninfas eclodem de seus ovos, a camada de material orgânica as protege contra a desidratação e exposição direta à luz solar (Garcia et al., 2006). As ninfas de *M. fimbriolata* alimentam-se principalmente do conteúdo xilemático de raízes jovens e tenras (Mendonça & Mendonça, 2005). Como a seiva do xilema é pobre em energia e aminoácidos, grandes quantidades precisam ser sugadas para atender às necessidades nutricionais desses insetos (Fewkes, 1969).

A resistência de plantas a insetos-praga envolve muitos fatores e compostos que podem estar presentes no hospedeiro constitutivamente ou serem produzidos após a indução de uma resposta (Nutt et al., 2004). Os compostos fenólicos constituem um grupo de metabólitos secundários que exerce papéis importantes nas plantas, como a proteção contra estresses ambientais (Hahlbrock & Scheel, 1989). Em insetos-praga, esses compostos podem atuar como inibidores digestivos ou produzindo radicais livres (Appel, 1993).

O ácido clorogênico, um derivado do ácido cinâmico, e a rutina, um glicosídeo-flavonóide, são modelos no estudo das defesas de plantas contra herbivoria devido às suas amplas ocorrências em vegetais superiores e conhecida toxicidade a insetos-praga. A oxidação do ácido clorogênico produz quinonas que se ligam covalentemente às proteínas e consequentemente limitam sua disponibilidade como alimento (Friedman, 1997). Essa oxidação também pode resultar na produção de espécies reativas de oxigênio (radical superóxido e H_2O_2),

as quais danificam lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Appel, 1993; Summers & Felton, 1994).

A caracterização dos tipos e quantidades de compostos fenólicos que são produzidos em resposta à infestação de insetos é importante para o conhecimento da interação planta-praga, além de ser de grande utilidade no desenvolvimento de novas estratégias de controle e em programas de melhoramento de plantas que buscam resistência genotípica.

A resposta fisiológica da cana-de-açúcar a *M. fimbriolata* é ainda pouco caracterizada. Neste trabalho determinamos como a cana-de-açúcar responde à infestação de ninfas de cigarrinha-das-raízes em termos de produção de compostos fenólicos em tecidos foliares e radiculares.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, e durante o mesmo a temperatura oscilou entre 22 e 33°C e a umidade relativa do ar foi mantida entre 50 e 60% por microaspersão automatizada. As variedades SP80-1816, RB72454 e SP83-5073, que apresentam reações distintas à cigarrinha-das-raízes, foram plantadas em bandejas de isopor de 64 células (5 x 10 cm) contendo o substrato comercial Plantmax® HT (Eucatex). Para o plantio foram utilizados toletes de uma gema.

As plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 15 litros contendo solo de textura média, corrigido com calcário dolomítico e fertilizado de acordo com as recomendações do boletim 100 para cana-de-açúcar. O transplântio foi realizado aos 27 dias após o plantio. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2 x 4, sendo 3 genótipos de cana-de-açúcar, 2 níveis de infestação da praga (controle e 10 ninfas planta⁻¹), e 4 épocas de amostragem. Quatro repetições experimentais foram utilizadas. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de

médias foi realizada através do teste de Tukey (5% de probabilidade). Foram realizadas análises de correlação entre os níveis de compostos fenólicos e a mortalidade e duração da fase ninfal de *M. fimbriolata*.

Criação de insetos e infestação

Os vasos foram cobertos com 65 g de pontas e folhas de cana-de-açúcar picadas e secas ao sol por 48h (70-80% de massa seca, correspondentes a 9 t ha⁻¹), com o objetivo de manter as condições de umidade e temperatura do solo, simulando a cobertura de palha que ocorre no campo. A cobertura foi realizada 17 dias antes da infestação de ninfas de *M. fimbriolata*.

As ninfas do inseto foram produzidas no Laboratório de Tricograma do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Esalq-USP como descrito por Garcia et al. (2006). A infestação foi realizada quando as ninfas atingiram os 21 dias de idade utilizando-se pincéis nº 4, aos 94 dias após o plantio de cana-de-açúcar, no nível de 10 ninfas por planta, além do controle não infestado. Juntamente com as ninfas transferiu-se também a espuma, em abundância, para efeito de proteção dos insetos.

Para evitar o efeito dos adultos, que são sugadores de folhas, e que poderiam se acasalar e realizar oviposições ao acaso, os vasos foram cobertos com tela de náilon imediatamente após a infestação. Através de monitoramento diário, os adultos encontrados eram registrados e instantaneamente mortos.

Extração e análise de compostos fenólicos

Amostras de raízes jovens (± 10 g) foram cuidadosamente lavadas, secas com papel toalha e mantidas congeladas em nitrogênio líquido até as análises. Subamostras (4 g) foram picadas em pedaços de aproximadamente 50 mm e agitadas em 30 mL de metanol acidificado (1% HCl) por 12h a 4 °C. O extrato foi filtrado em papel Whatman # 42 e diluído 15 x. A análise de compostos fenólicos totais foi realizada conforme descrito por Silva et al. (2005).

Duração da fase ninfal e taxa de mortalidade

A presença de adultos na tela de náilon foi monitorada diariamente. Sempre que encontrados, a quantidade e o número de dias após a infestação eram registrados. A duração da fase ninfal foi determinada através de média ponderada pelo número de adultos, conforme a fórmula:

$$\frac{(Y_{na} \times Z_n) + (Y_{na} \times Z_{n+1}) + (Y_{na} \times Z_{n+2}) + \dots + (Y_{na} \times Z_{n+n})}{\text{Número de adultos}}$$

Em que:

Y_{na} = Número de adultos encontrados no dia

$Z_n \dots n+n$ = Número de dias após a infestação (DAI) + 21 (idade das ninfas no momento da infestação)

Para a determinação da taxa de mortalidade (TM), a cobertura de palha foi removida e o número de ninfas contado nas amostragens de raízes. O número de adultos encontrados no monitoramento diário foi adicionado ao número de ninfas, e a taxa de mortalidade (%) foi obtida através da fórmula:

$$TM (\%) = \left(1 - \frac{NN + NA}{\text{Total}} \right) \times 100$$

Em que:

TM (%) = Taxa de mortalidade

NN = Número de ninfas

NA = Número de adultos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variedades SP80-1816 e RB72454 acumularam compostos fenólicos em resposta à infestação de cigarrinhas (Figura 1B). A taxa de mortalidade e a duração da fase ninfal foram significativamente menores nesses genótipos, confirmando a susceptibilidade dos mesmos à cigarrinha (Figura 2).

Os níveis constitutivos desses compostos foram maiores na variedade SP83-5073, porém não houve efeito da infestação da praga no teor de fenóis nessa variedade (Figuras 1A, 1B).

Silva et al. (2005) mostraram que níveis mais elevados de fenóis parecem estar envolvidos com alguma tolerância da variedade SP86-42 a *M. fimbriolata*, porém estes autores não apresentam dados de biologia do inseto para sustentar a hipótese. Na presente pesquisa, a taxa de mortalidade e a duração da fase ninfal foram significativamente mais altas na variedade SP83-5073, indicando a possibilidade do envolvimento de um mecanismo de resistência do tipo antibiose (Figura 2).

Estudos anteriores demonstraram que há diferenças nos teores e nos tipos de compostos fenólicos em genótipos de cana-de-açúcar resistentes e suscetíveis a um coleóptero-praga de raízes (Nutt et al., 2004). No presente estudo, as variedades SP80-1816 e RB72454 mostraram acumular fenóis nas raízes quando atacadas por ninfas de *M. fimbriolata*. Por serem suscetíveis, é possível que o próprio dano causado pela praga tenha sido responsável pela produção de fenóis das raízes. Durante a morte celular, o conteúdo do vacúolo, rico em compostos fenólicos e proteinases, é liberado. À medida que as proteinases desdobram outras proteínas, são liberados aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), os quais têm peso sobre o teor de fenóis (Buchanan et al., 2000).

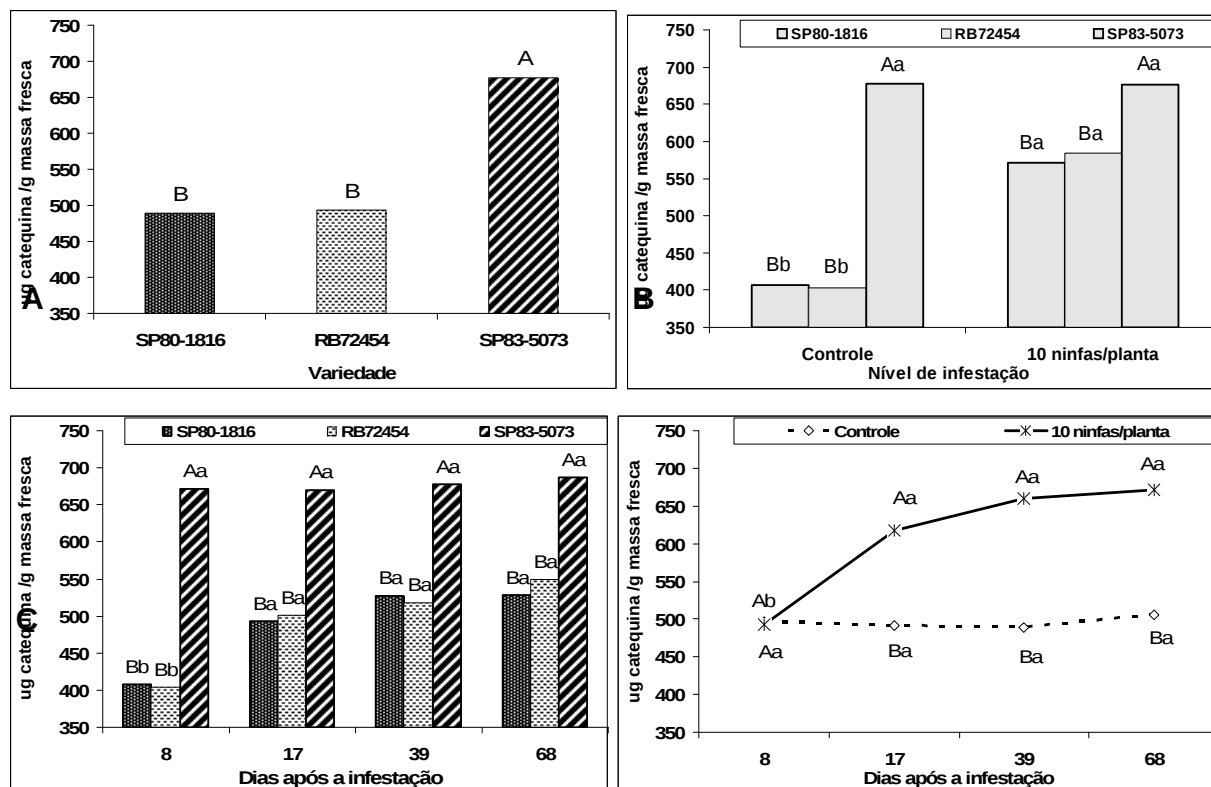


Figura 1. Médias dos teores de compostos fenólicos totais nos diferentes tratamentos. Letras maiúsculas comparam médias dentro de tratamentos e letras minúsculas comparam médias entre tratamentos.

Existem também relatos de que plantas que acumulam maiores teores de fenóis favorecem o desenvolvimento de pragas (Ghumare & Mukherjee, 2003; Beninger et al., 2004). No presente estudo foram encontrados mais sintomas de estresse nas variedades suscetíveis, que também acumularam maiores quantidades de compostos fenólicos. As larvas de um lepidóptero desenvolveram-se melhor em ramos intactos de plantas previamente atacadas de *Betula pubescens*, indicando uma suscetibilidade sistêmica induzida (Lempa et al., 2004).

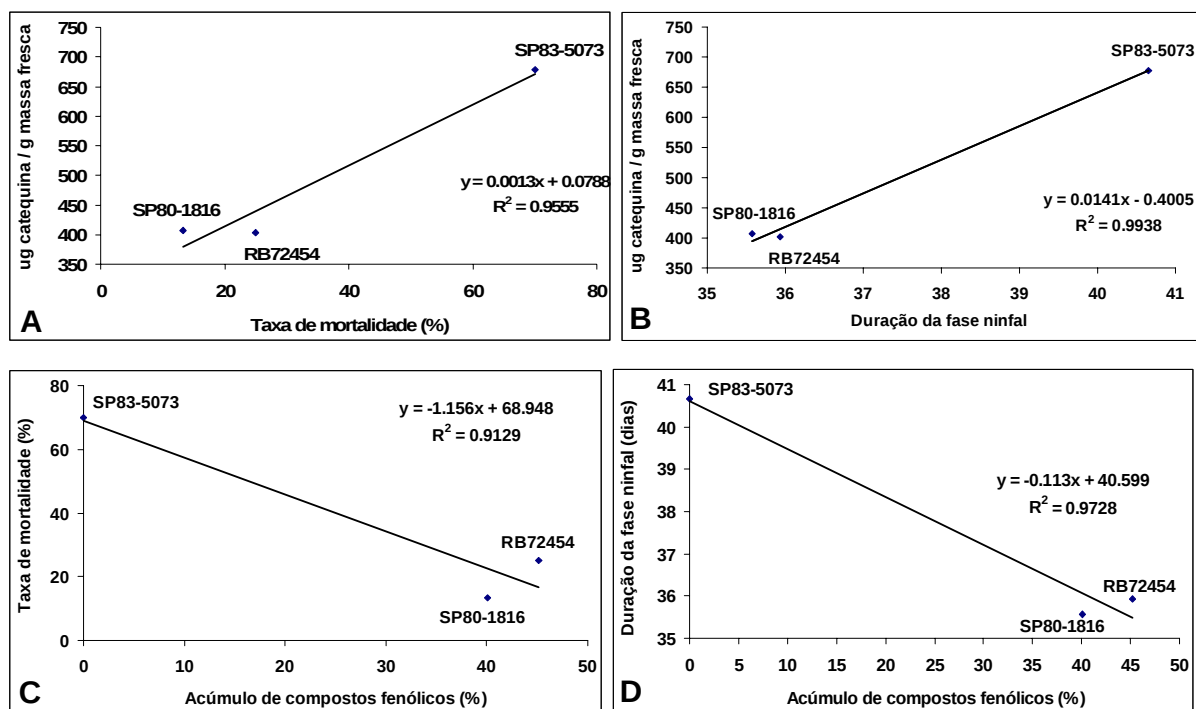


Figura 2. Correlações entre os teores de compostos fenólicos totais, taxa de mortalidade e duração da fase ninfal da cigarrinha-das-raízes.

Kudo (2003) relatou menor susceptibilidade à herbivoria em *Salix miyabeana* com teores constitutivamente elevados de compostos fenólicos. Correlações significativas foram encontradas entre a rigidez de folhas e a concentração de fenóis, explicando em parte a maior tolerância de genótipos com elevadas concentrações desses compostos. Essa correlação não foi estudada em raízes de cana de açúcar. Entretanto, é possível que a morfologia das raízes tenha influência na reação das variedades de cana-de-açúcar à cigarrinha-das-raízes, independentemente de sua relação com o teor de compostos fenólicos.

A cigarrinha *Philaenus spumarius*, assim como *M. fimbriolata*, alimenta-se principalmente da seiva xilemática. A saliva secretada por essa espécie forma uma estrutura envolvente entre o estilete e o tecido vegetal, a qual contém

compostos derivados de tanino e outros fenilpropanóides (Crews et al., 1998). É possível que fenóis oriundos do tanino tenham algum peso nos níveis superiores desses compostos observados nas variedades SP80-1816 e RB72454 sob infestação de cigarrinhas, o que reforça a hipótese de que o acúmulo de fenóis nesses genótipos susceptíveis esteja mais relacionado à alimentação das ninfas do que a um mecanismo de defesa a base de fenóis.

CONCLUSÕES

O acúmulo de compostos fenólicos nas variedades SP80-1816 e RB72454 quando infestadas com *M. fimbriolata* pode estar relacionado à morte e decomposição de tecidos das raízes atacadas pelos insetos. A taxa de mortalidade relativamente baixa e a duração da fase ninfal nesses genótipos confirmam a susceptibilidade dos mesmos à cigarrinha-das-raízes.

Os níveis de compostos fenólicos constitutivamente altos na variedade SP83-5073 podem estar envolvidos num mecanismo de resistência do tipo antibiose, resultando em maior mortalidade e duração da fase ninfal.

Novas investigações podem confirmar a resistência da variedade SP83-5073 às cigarrinhas e determinar o papel dos compostos fenólicos na interação dessa praga com a cana-de-açúcar.

O teor de compostos fenólicos totais não é um parâmetro preciso para identificar a resistência genotípica de cana-de-açúcar à cigarrinha-das-raízes.

REFERÊNCIAS

APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.1521-1552, 1993.

BENINGER, C. W.; ABOU-ZAID, M. M.; KISTNER, A. L.; HALLETT, R. H.; IQBAL, M. J.; GRODZINSKI, B.; HALL, J. C. A flavanone and two phenolic acids from

Chrysanthemum morifolium with phytotoxic and insect growth regulating activity. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, p.589-606, 2004.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

CREWS, L.J.; MCCULLY, M.E.; CANNY, M.J.; HUANG, C.X.; LING, L.E.C. Xylem feeding by spittlebug nymphs: some observations by optical and cryo-scanning electron microscopy. *American Journal of Botany*, v. 85, n. 4, pp. 449-460, 1998.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. (Ed.) **Pragas de Solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa, 2004. p. 495-516.

FEWKES, D.W. The biology of sugar cane froghoppers. In: WILLIAMS, J.R.; METCALFE, J.R.; MUNGOMERY, R.W.; MATHES, R. (Ed.) **Pests of sugar cane**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1969. p. 281-307.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, 2006.

GHUMARE, S.S.; MUKHERJEE, S.N. Performance of *Spodoptera litura* Fabricius on different host plants: influence of nitrogen and total phenolics of plants and mid-gut esterase activity of the insect. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.41, p.895-899, 2003.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.347-369, 1989.

KUDO, G. Variations in leaf traits and susceptibility to insect herbivory within a *Salix miyabeana* population under field conditions. **Plant Ecology**, v. 169, n. 1, 2003.

LEMPA, K.; AGRAWAL, A.A.; SALMINEN, J.P.; TURUNEN, T.; OSSIPOV, V.; OSSIPOVA, S.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Rapid herbivore-induced changes in mountain birch phenolics and nutritive compounds and their effects on performance of the major defoliator *Epirrita autumnata*. **Journal of Chemical Ecology**, v.320, p.303-321, 2004.

MENDONÇA, A.F.; MENDONÇA, I.C.B.R. Cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). In: MENDONÇA, A.F. (Ed.) **Cigarrinhas da cana-de-açúcar. Controle biológico**. Maceió: Insecta, 2005. cap. 3, p. 95-200.

NUTT, K. A.; O'SHEA, M. G.; ALLSOPP, P. G. Feeding by sugarcane whitegrubs induces changes in the types and amounts of phenolics in the roots of sugarcane. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.155–165, 2004.

SILVA, R.J.N., GUIMARÃES, E.R., GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; FERRO, M.I.T.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Infestation of froghopper nymphs changes the amounts of total phenolics in sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 6, p. 543-546, 2005.

SUMMERS, C. B.; FELTON, G. W. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.24, p.943-953, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed editora, 3ª ed., 2004, 719 p.

THOMPSON, V. Associative nitrogen fixation, C₄ photosynthesis, and the evolution of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) as major pests of neotropical sugarcane and forage grasses. **Bulletin of Entomological Research**, v. 94, p. 189–200, 2004.